

# **Die P-loop-ATPase MipZ**

## **Mechanismus der Bildung eines Proteingradienten in einer prokaryotischen Zelle**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von  
Diplom-Biologin  
**Daniela Kiekebusch**  
aus Königs Wusterhausen

Marburg (Lahn), März 2011

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (HKZ: 1180)  
als Dissertation angenommen: am 28.04.2011

Erstgutachter: Jun.-Prof. Dr. Martin Thanbichler  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Erhard Bremer

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2011

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2007 bis Februar 2011 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie unter der Leitung von Jun.-Prof. Dr. Martin Thanbichler durchgeführt.

Die während der Promotion erzielten Ergebnisse werden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

D. Kiekebusch, K.A. Michie, L.-O. Essen, J. Löwe, M. Thanbichler (2011). How to generate a protein gradient within a bacterial cell: dynamic localization cycle of the cell division regulator MipZ (in Vorbereitung)

Weitere Veröffentlichungen:

P. Voss, L. Horakova, M. Jakstadt, D. Kiekebusch, T. Grune, (2006) Ferritin oxidation and proteasomal degradation: protection by antioxidants *Free Radic Res* **40**: 673-83.





# ABSTRACT

Protein gradients have a key role in the spatial regulation of biological processes, thereby contributing to the complexity of both prokaryotic and eukaryotic organisms. In eukaryotes, intracellular protein and protein phosphorylation gradients were shown to be involved in embryonic development, mitotic spindle morphogenesis and cell division. Similarly, phosphorylation gradients are critical for the establishment of asymmetry in prokaryotes. However, well-studied examples for protein concentration gradients are still rare for these organisms. At the scale of a small prokaryotic cell, intracellular concentration gradients have long been assumed to be unsustainable due to the process of diffusion. Nevertheless, steady-state concentration gradients can be maintained in bacteria, as exemplified by the bipolar gradient of the P-loop-ATPase MipZ which is required for proper division site placement in the  $\alpha$ -proteobacterium *Caulobacter crescentus*. MipZ interacts with a kinetochore-like nucleoprotein complex formed by the chromosome segregation protein ParB in the vicinity of the chromosomal origin of replication. Upon entry into S-phase, the two newly duplicated origin regions are partitioned and sequestered to opposite cell poles, resulting in a bipolar distribution of MipZ with a defined concentration minimum at mid-cell. Acting as a direct inhibitor of the essential cell division protein FtsZ, MipZ thus restricts cytokinesis to the cell center.

In this study, the mechanism underlying the formation of the MipZ gradient was analyzed. Based on the crystal structures of the apo and ATP-bound protein and by means of mutant variants of MipZ, I dissected the role of nucleotide binding and hydrolysis. Gradient formation is found to rely on nucleotide-regulated alternation of MipZ between a monomeric and dimeric form. MipZ monomers interact with ParB, which results in the recruitment of MipZ to the polar regions of the cell. Upon ATP binding, MipZ dimerizes and is converted into its biologically active form that inhibits FtsZ assembly. Moreover, diffusion of the dimer is decelerated by its association with the nucleoid. The MipZ gradient can thus be envisioned as an asymmetric distribution of dimers that are released from a polar pool and slowly diffuse towards mid-cell. By virtue of the marked differences in the interaction networks and diffusion rates of monomers and dimers, ATP hydrolysis promotes oscillation of MipZ between the polar ParB complexes and pole-distal regions of the nucleoid. The MipZ gradient thus represents the steady-state distribution of molecules in a highly dynamic system, providing a general mechanism for the establishment of protein gradients within the confined space of the bacterial cytoplasm.

The generation of a concentration gradient by a P-loop-ATPase of the Mrp/MinD family exemplifies the diverse regulatory strategies and interaction networks that are used by different family members to fulfill their particular function in the cell. Concurrently, the unique features of MipZ identify it as the member of a novel subfamily of Mrp/MinD proteins.



## *Meinen Eltern*

*„Was wir wissen, ist ein Tropfen,  
was wir nicht wissen, ein Ozean.“*

*Isaac Newton*



# INHALT

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Mechanismen der DNA-Segregation .....	1
1.1.1	Typ I-Plasmid-Segregationssysteme.....	3
1.1.2	Typ II-Plasmid-Segregationssysteme .....	4
1.1.3	Chromosomensegregation in <i>B. subtilis</i> und <i>V. cholerae</i> .....	4
1.1.4	Chromosomensegregation in <i>C. crescentus</i> .....	5
1.2	Der Z-Ring.....	8
1.3	Räumliche und zeitliche Regulation der Zellteilung.....	9
1.3.1	Das MinCD-System und <i>nucleoid occlusion</i> in <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i> .....	9
1.3.2	Das MipZ System in <i>Caulobacter crescentus</i> .....	11
1.4	Proteingradienten .....	14
1.5	Zielstellung der Arbeit .....	15
<b>2</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>17</b>
2.1	MipZ dimerisiert in Abhängigkeit von ATP .....	17
2.1.1	Kristallstruktur von apo-MipZ .....	17
2.1.2	Kristallstruktur von MipZ <sub>D42A</sub> in Gegenwart von ATPγS .....	18
2.1.3	ATP-Bindung ist eine Voraussetzung für die Dimerisierung.....	21
2.2	Der Nukleotidaustausch durch MipZ kann spontan erfolgen.....	25
2.2.1	Analyse der Nukleotidbindung mittels Stopped-Flow .....	25
2.2.2	Analyse der Nukleotidbindung mittels Gleichgewichtsmessungen.....	29
2.3	Die biologisch aktive Form von MipZ ist das Dimer.....	31
2.4	MipZ Monomere und Dimere besitzen unterschiedliche Interaktionspartner und Mobilitäten.....	35
2.4.1	Die Interaktion von MipZ mit ParB ist konstitutiv.....	35
2.4.2	Das MipZ-Dimer bindet unspezifisch und nicht-kooperativ an DNA.....	38
2.4.3	Die Bindung des MipZ Dimers an die DNA konkurriert mit der Bindung an ParB .....	42
2.4.4	Die Bindung an das Nukleoid bestimmt die Mobilität von MipZ .....	43
2.5	Der ATPase-Zyklus ist essentiell für die Gradientenbildung und Funktionalität von MipZ.....	46
2.6	Der C-terminale Bereich von MipZ ist an der Interaktion mit ParB und dem Nukleoid beteiligt .....	49
2.6.1	Lokalisation von MipZ-Homologen in <i>C. crescentus</i> .....	49
2.6.2	Identifizierung von drei für die Funktion potentiell bedeutenden Resten in MipZ .....	50

2.6.3	Der ATPase-Zyklus und die Interaktion mit FtsZ werden durch die Aminosäuresubstitutionen nicht beeinflusst .....	53
2.6.4	MipZ interagiert über seinen C-terminalen Bereich mit ParB .....	55
2.6.5	Die Interaktionsdomänen für ParB und DNA überlappen .....	57
2.6.6	Verifizierung der durch DNA-Bindung reduzierten MipZ-Dynamik .....	59
<b>3</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>61</b>
3.1	Modell zur Gradientenbildung von MipZ .....	61
3.2	Räumliche Regulation der Zellteilung: MipZ im Vergleich zum Min-System .....	65
3.3	Monocistronisch kodierte ParA-ähnliche Proteine .....	67
3.4	MipZ-Homologe: Eine neue Unterfamilie der Mrp/MinD-Familie .....	68
3.5	Zusammenfassung und Ausblick .....	70
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>73</b>
4.1	Material .....	73
4.1.1	Chemikalien und Enzyme .....	73
4.1.2	Puffer und Lösungen .....	73
4.1.3	Medien .....	73
4.1.4	Oligonukleotide und Plasmide .....	75
4.1.5	Stämme .....	75
4.2	Mikrobiologische und zellbiologische Methoden .....	76
4.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	76
4.2.2	Kultivierung von <i>C. crescentus</i> .....	76
4.2.3	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	76
4.2.4	Lagerung der Stämme .....	76
4.2.5	Hefe-Ein-Hybrid-Analyse .....	77
4.3	Molekularbiologische Methoden .....	77
4.3.1	Konstruktion der Plasmide .....	77
4.3.2	DNA-Präparation und –Sequenzierung .....	78
4.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	79
4.3.4	Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten .....	80
4.3.5	Agarosegelelektrophorese .....	80
4.3.6	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	80
4.3.7	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	81
4.3.8	Herstellung und Transformation elektrokompeter <i>C. crescentus</i> .....	81
4.3.9	Transduktion von <i>C. crescentus</i> .....	82
4.4	Biochemische Methoden .....	82
4.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	82
4.4.2	Western Blot .....	83
4.4.3	Heterologe Überexpression in <i>E. coli</i> .....	83
4.4.4	Proteinaufreinigung .....	84
4.4.5	Enzymatische Aktivitätstests .....	86
4.4.6	Oberflächen-Plasmon-Resonanz .....	86

---

4.4.7 Elektrophoretischer Mobilitätsshift Assay (EMSA) .....	87
4.5 Mikroskopische Methoden.....	87
4.5.1 Fluoreszenzmikroskopie.....	87
4.5.2 FRAP.....	88
4.6 Fluoreszenzspektroskopische Methoden.....	89
4.6.1 Kinetische Messungen mittels Stopped-Flow .....	89
4.6.2 Gleichgewichtsmessungen.....	89
4.7 Bioinformatische Methoden .....	90
<b>A Appendix .....</b>	<b>91</b>
A.1 Verwendete Oligonukleotide, Plasmide und Stämme.....	91
A.2 Proteinsequenzen für die phylogenetische Analyse.....	94
A.3 Daten zur Kristallisation.....	96
A.4 Herleitung der Dimerisierungsgleichung .....	97
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>





# 1 EINLEITUNG

Die Energie, die bei der Hydrolyse von Nukleotiden frei wird, ist elementar für unzählige biologische Prozesse. Proteine, die Nukleotide binden und hydrolysieren, enthalten verschiedene, für bestimmte Klassen charakteristische Strukturelemente. Eine der am weitesten verbreiteten Klassen wird von den P-loop (für Phosphat) NTPasen gebildet, die in allen Domänen des Lebens, Bacteria, Archaea und Eukarya, zu finden sind. Es wird davon ausgegangen, dass ca. 5-10 % aller in einem komplett sequenzierten und annotierten Genom kodierten Proteine eine P-loop Domäne besitzen<sup>[100]</sup>. Die meisten P-loop NTPasen katalysieren die Hydrolyse der  $\beta$ - $\gamma$ -Phosphatbindung des gebundenen Nukleotids und nutzen die bei dieser Reaktion frei werdende Energie, um von einer aktiven in eine inaktive Form überzugehen. Auf diese Weise wirken sie als molekulare Schalter, die diverse zelluläre Prozesse regulieren, wie z.B. Stickstoffassimilation, Membrantransport, Motilität, Translation und Proteinlokalisierung<sup>[99,113]</sup>. In den letzten Jahrzehnten ist darüber hinaus deutlich geworden, dass bestimmte, mit P-loop GTPasen verwandte ATPasen am koordinierten Ablauf des prokaryotischen Zellzyklus beteiligt sind.

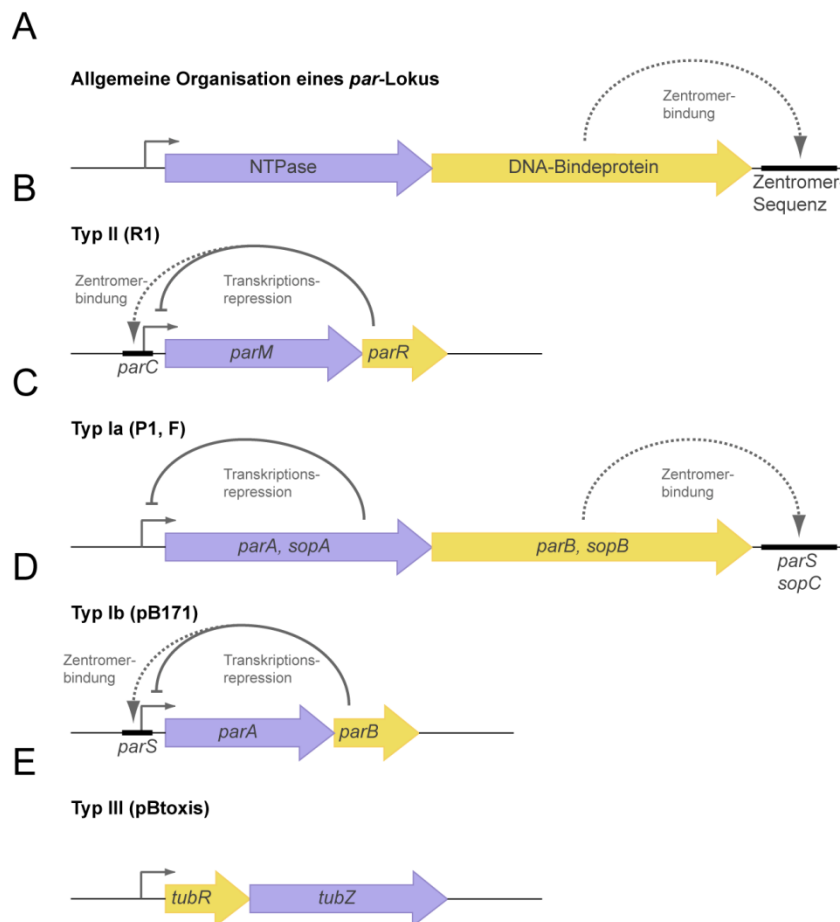
Der Zellzyklus umfasst den Zeitraum von der Geburt einer Zelle bis zu ihrer Teilung und beinhaltet unter anderem die Vervielfältigung ihrer genetischen Information. Um sicherzustellen, dass die Zytokinese lebensfähige Nachkommen hervorbringt und gleichzeitig die Integrität der Mutterzelle erhalten bleibt, werden die Prozesse der DNA-Replikation, DNA-Segregation und Einleitung der Zellteilung genau reguliert und miteinander koordiniert. Von entscheidender Bedeutung für die zeitliche und räumliche Abstimmung dieser Abläufe sind unter anderem die Aktivitäten von ATPasen aus der Mrp/MinD-Familie, wie z.B. ParA/Soj- und MinD-Proteine<sup>[113]</sup>.

## 1.1 Mechanismen der DNA-Segregation

Lange Zeit war unklar, wie Prokaryoten ihre replizierten DNA-Moleküle zuverlässig und geordnet segregieren. Technologische Fortschritte unter anderem in mikroskopischen Verfahren sowie die Anwendung fluoreszierender Proteine in der Mikroskopie offenbarten, dass Prokaryoten entgegen vorheriger Annahmen alles andere als einfache, unstrukturierte „Enzymbeutel“ sind, sondern vielmehr eine hochgradige interne Strukturierung mit einem komplexen Zytoskelett aufweisen<sup>[199]</sup>. Gleichzeitig ermöglichten diese Technologien ebenso einen tieferen Einblick in die bakterielle DNA-Segregation. Erste Hinweise auf eine aktive Positionierung und Teilung bakterieller DNA resultierten aus Studien an Plasmiden, die *in vivo* in geringer Kopienzahl vorliegen (*low copy number*-Plasmide). *In vivo*-Untersuchungen zeigten, dass diese Plasmide spezifische Positionen in der Zelle einnehmen und aktiv voneinander getrennt werden<sup>[43,72,153]</sup>. Als Segregationsapparat wurden sogenannte Par-Systeme (für *partitioning*, Teilung) identifiziert. Derzeit gibt es drei bekannte Par-Systeme, die an der bakteriellen Plasmidsegregation beteiligt sind: (i) basierend auf Walker A P-loop-ATPasen, (ii) basierend auf Aktin-ähnlichen Zytoskelettfilamenten und (iii) basierend auf Tubulin-ähnlichen GTPasen. Das System, welches eine Aktin-ähnliche ATPase verwendet, wurde auch als Typ II-Segregationssystem bezeichnet, während Systeme basierend auf einer Walker A P-loop-ATPase als Typ I klassifiziert werden. Letztere lassen sich aufgrund des Vorhandenseins bzw.

der Abwesenheit eines N-terminalen DNA-Bindemotivs (HTH-Motiv) in der ATPase weiterhin in Typ Ia bzw. Typ Ib unterteilen<sup>[59]</sup>. Par-Systeme, die eine GTPase besitzen, wurden erst kürzlich entdeckt<sup>[107,150]</sup> und könnten als Typ III-Systeme bezeichnet werden<sup>[185]</sup>.

Alle Par-Systeme haben eine sehr ähnliche genetische Organisation, bestehend aus drei Elementen (**Abbildung 1.1**), welche in den meisten Fällen in der Nähe des Replikationsursprungs zu finden sind. Sie enthalten Zentromer-ähnliche Sequenzen (*parC* bzw. *parS*), ein Zentromer-Bindeprotein (ParR bzw. ParB) und eine NTPase (ParM bzw. ParA oder TubR), die mit dem zentromeren Nukleoproteinkomplex interagiert<sup>[58]</sup>. Die beiden Proteine sind in einem Operon organisiert, wobei die NTPase stets stromaufwärts kodiert ist. In unmittelbarer Nähe zu diesem Operon befindet sich stromauf- oder -abwärts die Zentromer-ähnliche DNA-Sequenz.



**Abbildung 1.1: Genetische Organisation von Par-Systemen.** (A) Allgemeine Organisation eines *par*-Lokus, bestehend aus einer NTPase, einem DNA-Bindeprotein und einer Zentromer-Sequenz. Spezifischer Aufbau eines (B) Typ II *par*-Lokus, (C) Typ Ia *par*-Lokus, (D) Typ Ib *par*-Lokus und (E) eines Typ III Par-Systems. (modifiziert nach Ref.<sup>[58]</sup>)

Zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Analysen von Typ I- und Typ II-Systemen verdeutlichten, dass die Segregation der entsprechenden Plasmide nach zwei fundamental unterschiedlichen Mechanismen abläuft. Typ II-Systeme (z.B. das Plasmid R1 aus *Escherichia coli*) drängen gepaarte Plasmide in entgegengesetzte Richtungen auseinander, so dass diese nach der Segregation an den beiden Zellpolen lokalisieren<sup>[86]</sup>. Im Gegensatz dazu scheinen Systeme, die eine P-loop-ATPase kodieren

(Typ I), Plasmide zu separieren, indem sie diese entlang des Nukleoids ausrichten und anschließend auseinanderziehen (z.B. *par2*-Lokus von pB171 aus *E. coli*)<sup>[175]</sup>.

Eine Analyse zahlreicher bakterieller Genome zeigte, dass die meisten von ihnen ebenfalls Par-Systeme besitzen, welche bei genauerer phylogenetischer Untersuchung am ähnlichsten zu Typ Ib-Plasmid-Segregationssystemen sind<sup>[59]</sup>. Das bedeutet, ihren ATPasen fehlt die N-terminale DNA-Bindedomäne zur Autoregulation des *parABS*-Operons. Tiefere Einblicke in die Rolle, die diese Systeme in der Chromosomensegregation spielen, wurden erst in den letzten Jahren gewonnen.

### 1.1.1 Typ I-Plasmid-Segregationssysteme

Typ I-Segregationssysteme sind die mit Abstand am weitesten verbreiteten Mechanismen zur Trennung prokaryotischer DNA. Dennoch ist der diesen Systemen zugrundeliegende molekulare Mechanismus nicht im Detail aufgeklärt. Typische Beispiele für Replikons, die sich dieser Systeme bedienen, sind die *E. coli* Plasmide P1 und F (Typ Ia) sowie pB171 und Plasmid TB228 (Typ Ib). Typ Ia- und Typ Ib-Systeme unterscheiden sich hauptsächlich in Bezug auf das Molekulargewicht der kodierten Proteine und die Regulation des *par*-Operons. Davon abgesehen zeichnen sie sich jedoch durch einen ähnlichen Segregationsmechanismus aus. ParB-Proteine binden zur Ausbildung eines Nukleoproteinkomplexes an *parS*-Sequenzen und interagieren mit ParA<sup>[6,171,175]</sup>. ParA-Proteine besitzen eine schwache, kooperative ATPase-Aktivität, die durch ParB allein oder zusammen mit Zentromer-DNA stimuliert wird<sup>[6,22,36,165]</sup> und polymerisieren ATP-abhängig zu Protofilamenten, welche sich zu großen Bündeln zusammenlagern können<sup>[7,13,45,119]</sup>. Welche Funktion aber übernimmt die P-loop-ATPase ParA beim Segregationsprozess? *In vivo*-Untersuchungen zeigen, dass die DNA-Moleküle in einem spezifischen Muster lokalisieren, welches vom Vorhandensein des Par-Systems abhängt und sich von dem der Typ II-Plasmide unterscheidet<sup>[45]</sup>. Besitzen Zellen nur ein Plasmid, befindet sich dieses in der Zellmitte, wohingegen zwei Plasmide zu den zukünftigen Zellzentren lokalisieren<sup>[43,63,68,153]</sup>. Diese dynamische Lokalisation der Plasmide korreliert mit der Bewegung der ParA-Proteine, die *in vivo* eine hochdynamische Oszillation über dem Nukleoid darstellt<sup>[44,119,165]</sup>. Darüber hinaus ist diese Dynamik von der ATPase-Aktivität abhängig<sup>[43]</sup>. Die Koloalisation mit dem Nukleoid stimmt mit der Beobachtung überein, dass ParA-Proteine unspezifisch und ATP-abhängig an DNA binden<sup>[22,165,175]</sup>. Auf diese Weise scheinen ParA-Proteine Plasmide gleichmäßig entlang des Nukleoids zu positionieren. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass Plasmide ohne Par-System zufällig verteilt in chromosomenfreien Bereichen der Zelle vorliegen<sup>[153]</sup>, sowie dadurch, dass Zellen, die mehr als zwei Plasmidcluster akkumulieren, diese gleichmäßig entlang der Längsachse positionieren<sup>[45,119]</sup>. Die *in vivo*-Analyse der relativen Bewegungen von ParA und Plasmiden in einzelnen Zellen offenbarte, dass eine von einem Zellpol ausgehende, wachsende ParA-Struktur, sobald sie ein Plasmid kontaktiert hatte, aufhörte sich zu verlängern und stattdessen begann, sich zu verkürzen. Die Plasmide folgten dabei stets den sich zurückziehenden Enden der ParA-Struktur<sup>[175]</sup>. Ausgehend von diesen Beobachtungen und unter Berücksichtigung der biochemischen und zellbiologischen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen wurde ein mathematisches Modell (*pulling*-Modell) aufgestellt, wodurch die experimentellen Beobachtungen sehr gut simuliert wurden<sup>[175]</sup>. Auch wenn feine mechanistische Unterschiede zwischen den einzelnen Plasmidsystemen bestehen<sup>[58,199]</sup>, scheinen Typ I-Systeme generell DNA-Moleküle zu trennen, indem sie diese auseinanderziehen.

### 1.1.2 Typ II-Plasmid-Segregationssysteme

Der wohl am besten untersuchte Mechanismus prokaryotischer DNA-Segregation ist das ParMRC-System des konjugativen Plasmids R1 aus *E. coli*. Dessen DNA-Bindeprotein ParR bindet kooperativ an die aus 10 *parC*-Sequenzen bestehende Zentromerregion. Dieser Komplex wird daraufhin durch die Aktin-ähnliche ATPase ParM erkannt, deren hydrolytische Aktivität essentiell für den Segregationsprozess ist<sup>[87,143]</sup>. ParM polymerisiert *in vitro* ATP-abhängig zu dynamischen Filamenten<sup>[144]</sup>, bestehend aus einer zweisträngigen, linksgängigen Helix<sup>[158,163]</sup>. Im Unterschied zur Dynamik von F-Aktin, jedoch sehr ähnlich zur dynamischen Instabilität eukaryotischer Mikrotubuli, unterliegen ParM-Filamente einem ständigen Wechsel zwischen Assemblierung und Disassemblierung<sup>[57]</sup>. Da nur die ATP-gebundene Form die Polymerisation induziert, die ATPase-Aktivität von ParM jedoch kooperativ ist, wird ATP in filamentgebundenen Untereinheiten schnell hydrolysiert, was wiederum den Zerfall des Polymers hervorruft. Diese Disassemblierung wird nur verhindert, wenn das Filament durch ATP-gebundene Untereinheiten an den Enden stabilisiert wird. Es wurde gezeigt, dass ein ParM-Filament je ein Plasmid an jedem Ende binden kann<sup>[29]</sup>, wobei die Polymerisation von ParM die zuvor gepaarten Plasmide in einem der Mitose ähnlichen Prozess zu trennen scheint<sup>[143]</sup>. Unterstützung fand diese Hypothese durch Untersuchungen an lebenden Zellen, bei denen erstmals gezeigt werden konnte, dass die ParMRC-Spindel gepaarte Plasmide trennt, indem sie diese innerhalb weniger Sekunden zu entgegengesetzten Polen bewegt<sup>[21]</sup>. Der biochemische Mechanismus dieses Prozesses konnte schließlich durch die *in vitro*-Rekonstitution des R1-Segregationsapparates aufgeklärt werden<sup>[57]</sup>. Fluoreszenzmarkierte *parC*-DNA-Fragmente wurden an Kügelchen gekoppelt, mit ParR inkubiert und anschließend mit fluoreszenzmarkiertem ParM gemischt. In Gegenwart von ATP bildete ParM, ausgehend von den *parC*/ParR-Komplexen, dynamische Filamente aus, die einem ständigen Wachstum und Zerfall unterworfen waren. Sobald jedoch ein Filament über seine Enden Kontakt zu jeweils einem *parC*/ParR-Komplex aufgenommen hatte, verlängerten sich die Filamente und drückten die Kügelchen in entgegengesetzte Richtungen auseinander. Die Elongation der ParM-Filamente erfolgte ausschließlich am Übergang zum terminal gebundenen *parC*/ParR-Komplex, der die ParM-Filamente stabilisierte und ihre spontane Disassemblierung verhinderte. Diese Beobachtungen zeigen, dass keine zusätzlichen zellkodierten Faktoren für die Trennung der DNA-Moleküle benötigt werden und führten schließlich zur Aufstellung des sogenannten *pushing*-Modells für die Plasmidsegregation durch das Typ II-Par-System<sup>[178]</sup>.

### 1.1.3 Chromosomensegregation in *B. subtilis* und *V. cholerae*

Die Segregation replizierter Chromosomen ist auch in Prokaryoten ein effizienter und geordneter Prozess, so dass die Bildung DNA-freier Zellen eine Ausnahme darstellt<sup>[11,71,82]</sup>. Da sich die Forschung lange Zeit auf Plasmidsysteme konzentrierte, blieben die Prozesse, die die gleichmäßige Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen sicherstellen, lange unbekannt. Die Identifizierung von chromosomal kodierten Par-Systemen<sup>[82,141]</sup> ließ vermuten, dass die Chromosomensegregation nach einem ähnlichen Mechanismus abläuft wie die Trennung replizierter Plasmide<sup>[53,83,121,204]</sup>. Andererseits existieren Gattungen und Arten, in denen kein identifizierbares Par-System nachgewiesen werden konnte, wie z.B. *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma*-Spezies und diverse Arten aus dem Reich der Archaea<sup>[121]</sup>. In *E. coli* wurde eine 25 bp lange Sequenz identifiziert, *migS* genannt, die für die Segregation von DNA nahe des Replikationsursprungs essentiell ist<sup>[51,222]</sup>. Es bleibt abzuwarten, welche Rolle *migS* bei der Trennung der Chromosomen übernimmt und wie die anderen Organismen, die sehr gut ohne *migS* oder ein

Par-System überleben, ihre Nukleotide im Vorlauf der Zellteilung trennen. Des Weiteren segregieren die meisten untersuchten Organismen, die ein ParABS-System besitzen, ihre Chromosomen normal, auch wenn das Par-System inaktiviert wurde. Zu ihnen gehören der Modellorganismus *Bacillus subtilis* sowie *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces coelicolor* und *Vibrio cholerae* (Chr I)<sup>[53,82-83,117,220]</sup>. Eine Deletion der Par-Komponenten führt hier vorrangig während entwicklungsspezifischer Veränderungen wie z.B. der Sporulation oder dem Eintritt in die stationäre Phase zu Segregationsdefekten<sup>[61,98,117]</sup>. Zusammenfassend implizieren diese Beobachtungen die Existenz weiterer, noch nicht entdeckter, redundanter Mechanismen der Chromosomentrennung.

Die chromosomalen Par-Systeme aus *B. subtilis* und *V. cholerae* gehören zu den am besten untersuchten Beispielen bakterieller Segregationssysteme. Dennoch ist der den Aktivitäten dieser Par-Systeme zugrundeliegende molekulare Mechanismus nur unzureichend verstanden. Eine Ursache mag darin liegen, dass die Par-Proteine von sowohl *B. subtilis* als auch *V. cholerae* neben der Chromosomensegregation an verschiedenen weiteren zellulären Prozessen beteiligt zu sein scheinen, wie z.B. der Replikationsinitiation, so dass die Deletion der entsprechenden Gene einen pleiotropen Phänotyp hervorruft<sup>[82,92,111,155,186,217]</sup>. Dennoch konnte festgestellt werden, dass die Systeme in beiden Organismen verwandt mit Typ I-Plasmid-Segregationssystemen sind und verschiedene Eigenschaften mit diesen teilen. So kodieren beide Systeme P-loop-ATPasen, welche eine dynamische Lokalisation *in vivo* zeigen, die von der ATP-Bindung und -Hydrolyse abhängig ist<sup>[53,79,132,167]</sup>. Darüber hinaus scheinen die ATPasen, ebenso wie Plasmid-kodierte ParA-Proteine, oligomere Strukturen auszubilden und unspezifisch mit DNA zu interagieren<sup>[70,79]</sup>. Die DNA-Bindeproteine der Systeme beider Spezies bilden durch Bindung an *parS*-Sequenzen einen Nukleoproteinkomplex aus<sup>[19,53]</sup>, mit welchem die ATPase interagiert<sup>[53,167]</sup>. Welche Relevanz diese Eigenschaften für eine Par-vermittelte Chromosomensegregation in diesen Organismen haben, bleibt abzuwarten. Den bislang aussagekräftigsten Hinweis darauf, dass diese Par-Systeme einen funktionellen Segregationsapparat darstellen, liefert ein Experiment von Yamaichi und Niki, mit dem sie demonstrieren, dass der *par*-Lokus von *B. subtilis* ein miniF-Plasmid ohne Segregationssystem stabilisieren kann<sup>[221]</sup>.

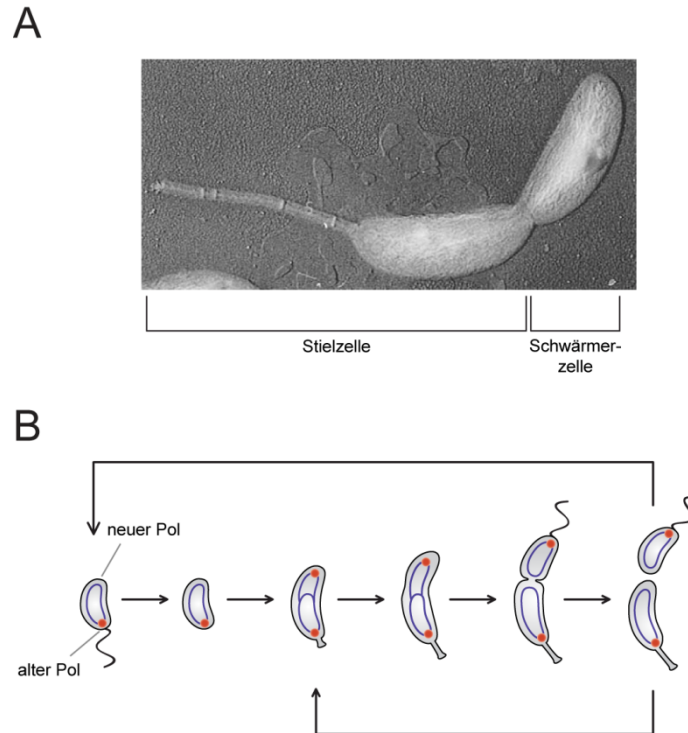
### 1.1.4 Chromosomensegregation in *C. crescentus*

#### Der Zellzyklus von *C. crescentus*

*C. crescentus* ist ein gram-negativer Organismus aus der Klasse der  $\alpha$ -Proteobakterien. Er ist weit verbreitet in oligotrophen, aquatischen Ökosystemen und wurde erstmals 1935 von Henrici und Johnson beschrieben<sup>[69]</sup>. Das ca. 4 Mbp umfassende Genom ist vollständig sequenziert<sup>[131,151]</sup>. *C. crescentus*-Zellen weisen eine crescentoide (halbmondförmige) Form auf, die durch Crescentin, einem Intermediärfilament-ähnlichen Protein, hervorgerufen wird<sup>[4]</sup>.

Charakteristisch für *C. crescentus* ist ferner seine asymmetrische Zellteilung<sup>[195]</sup>, aus der zwei morphologisch distinkte Tochterzellen hervorgehen: eine Schwärmer- und eine Stielzelle (**Abbildung 1.2 A**). Die Schwärmerzelle besitzt ein einzelnes polares Flagellum, welches die Mobilität vermittelt. Um die Zellteilung initiieren zu können, muss die Schwärmerzelle zunächst einen morphologischen Differenzierungsprozess durchlaufen, bei dem unter anderem das Flagellum durch einen Stiel ersetzt wird (**Abbildung 1.2 B**). Gleichzeitig mit der Einschnürung der Zelle erfolgt schließlich die Neusynthese eines Flagellums am Pol gegenüber dem Stiel. Die Zellteilung resultiert anschließend in der Bildung einer neuen Schwärmer- und einer Stielzelle.

Letztere ist in der Lage, sofort den nächsten Teilungszyklus einzuleiten, wohingegen sich die Schwärmerzelle zunächst in eine Stielzelle differenzieren muss.



**Abbildung 1.2: Der einzigartige dimorphe Lebenszyklus von *C. crescentus*.** (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *Caulobacter*-Zelle vor der Teilung in eine morphologisch distinkte Stiel- und Schwärmerzelle (entnommen aus Ref.<sup>[162]</sup>). (B) Schematische Darstellung des Zellzyklus von *C. crescentus* unter Einbeziehung der Chromosomensegregation. Die Lage des Replikationsursprungs ist durch einen roten Punkt markiert. Zur näheren Beschreibung siehe Text.

Im Zellzyklus von *C. crescentus* ist die DNA-Replikation (S-Phase) sehr eng mit der Zellteilung verbunden. Die Schwärmerzelle ist in einem, dem eukaryotischen Zellzyklus ähnlichen G1-Stadium arretiert und kann somit die Replikation der DNA nicht einleiten. Sie besitzt ein einziges Chromosom, das sich über das gesamte Zytoplasma erstreckt und dessen Replikationsursprung (*Cori*) am flagellierten Pol lokalisiert ist<sup>[85,208]</sup> (**Abbildung 1.2 B**). In der Nähe des Ursprungs befinden sich fünf konservierte Sequenzen (*parS*), welche durch das Chromosomensegregationsprotein ParB gebunden werden<sup>[52,141]</sup>. Die Verankerung des Replikationsursprungs an den Zellpolen wird durch das PopZ-Protein vermittelt<sup>[15-16,42]</sup>. Nach Differenzierung in eine Stielzelle wird, unter Beteiligung von DnaA und IHF (*integration host factor*), die Replikation des Chromosoms initiiert<sup>[146]</sup>. Die duplizierten Replikationsursprünge werden anschließend sofort durch ParB gebunden, und einer von ihnen bewegt sich unmittelbar auf den gegenüberliegenden Zellpol zu (**Abbildung 1.2 B**). Dieser Prozess beruht auf der aktiven Trennung der ParB-Nukleoproteinkomplexe durch die ATPase ParA (siehe unten). Der Hauptteil des Chromosoms dagegen wird durch passive Mechanismen segregiert, die vermutlich auf der DNA-Rekondensation beruhen<sup>[166,183,187,198,208]</sup>.

Die Koordination von Replikationsinitiation und Zellteilung erfolgt in *C. crescentus* über die Regulation der Aktivität und Abundanz des Zwei-Komponenten-Antwortregulators CtrA<sup>[168]</sup>. CtrA ist einer von vier Masterregulatoren des *Caulobacter*-Zellzyklus<sup>[110]</sup> und induziert bzw. reprimiert direkt die Expression von fast 100 Genen<sup>[108]</sup>. In seiner phosphorylierten Form (CtrA~P) inhibiert CtrA die Initiation der DNA-Replikation, indem es mit fünf spezifischen CtrA-Bindestellen im Replikationsursprung assoziiert, die mit den DnaA- und IHF-Bindestellen überlappen<sup>[169]</sup>. Letztere können so in Gegenwart von CtrA~P nicht an die DNA binden, wodurch die Replikationsinitiation in der Schwärmerzelle effektiv blockiert wird. In der Stielzelle induziert eine komplexe regulatorische Kette die Dephosphorylierung von CtrA, gefolgt von dessen Proteolyse und ermöglicht so den Eintritt in die S-Phase<sup>[32,196]</sup>. Gleichzeitig wird dadurch die Expression von Genen, die essentiell für die Zellteilung sind, induziert. So erlaubt erst die Degradation von CtrA, welches ein Repressor der *ftsZ*-mRNA-Synthese ist, die Transkription von *ftsZ* und damit die Einleitung der Zytokinese<sup>[97]</sup>.

## Segregation des Replikationsursprungs

Ähnlich wie bei Chr II von *V. cholerae* ist auch das Par-System von *C. crescentus* essentiell<sup>[141]</sup>. Die Überproduktion von ParA oder ParB, die Ausdünnung von ParB sowie die Einführung zusätzlicher *parS*-Sequenzen, oder Mutationen in der ATPase-Domäne von ParA resultieren in Zell- und Chromosomenteilungsdefekten<sup>[140-141,204]</sup>. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die ParAB-Proteine eine direkte Rolle bei der Chromosomentrennung spielen und *parS* die funktionelle Zentromer-Sequenz darstellt<sup>[204]</sup>. Davon abgesehen blieb der Mechanismus auch dieses Par-Systems lange Zeit ungeklärt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass ParA ATP-abhängig sowohl *in vitro* als auch *in vivo* polymere Strukturen ausbildet, die von der DNA-Bindfähigkeit von ParA abhängen<sup>[166,183]</sup>. Zusammen mit der Beobachtung, dass ParB mit ParA/DNA-Komplexen interagiert und deren Disassemblierung stimuliert, führte dies zur Aufstellung des folgenden Modells für die Chromosomensegregation in *C. crescentus*<sup>[166]</sup>: Der nach der Replikation neu gebildete *parS*/ParB-Komplex wird durch ParA-Filamente, ausgehend vom neuen Zellpol, gebunden. ParB stimuliert die ATPase-Aktivität von ParA, wodurch ParA-ADP-Moleküle vom Filament dissoziieren. ParB bindet anschließend erneut an das nun verkürzte ParA-Filament und wird so schrittweise von ParA zum neuen Pol „gezogen“ und dort durch den PopZ-Komplex verankert. Ein weiterer, vor kurzem entdeckter Faktor, der bei diesem Prozess eine Rolle spielt, ist TipN, ein Protein, das den neuen Zellpol markiert<sup>[80,104]</sup>. TipN stellt eine Senke für monomeres ParA dar, indem es dieses bindet. Auf diese Weise wird eine erneute Polymerisation von ParA hinter dem segregierenden *parS*/ParB-Komplex verhindert und eine gerichtete Translokation des Replikationsursprungs ermöglicht<sup>[183]</sup>.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass plasmidkodierte und chromosomale Par-Systeme klare funktionelle Übereinstimmungen aufweisen, die auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung hindeuten. ParB-Proteine bilden einen Nukleoproteinkomplex mit der Zentromersequenz aus. ParA-Proteine bilden polymere Strukturen und weisen ein dynamisches Lokalisationsmuster auf. Für beide Aktivitäten ist die ATPase-Aktivität von ParA essentiell. Ihre Stimulation durch ParB und/oder DNA beeinflusst den Oligomerisationszustand von ParA, wobei ParA-Proteine in der ADP-gebundenen Form als Monomere vorliegen, in Gegenwart von ATP aber Dimere bzw. Filamente bilden. Die Interaktion zwischen dem *parS*/ParB-Komplex und ParA resultiert in der Segregation der DNA. Plasmidkodierte Par-Systeme scheinen entweder einen *pushing*- oder einen *pulling*-Mechanismus zu verwenden, während die Trennung replizierter Chromosomen ebenfalls auf einem *pulling*-Mechanismus zu beruhen scheint.

Die schnelle, gerichtete und reproduzierbare Bewegung der chromosomalen Replikationsursprünge unterstützt das Modell, das die Chromosomensegregation durch einen mitotischen Apparat, das ParABS-System<sup>[53,82,166,183]</sup>, erfolgt. Interessanterweise scheinen chromosomale Par-Systeme, im Gegensatz zu ihren plasmidkodierten Homologen, nur an der Trennung der Replikationsursprünge beteiligt zu sein<sup>[53,111,204,216-217]</sup>, während der Rest des Nukleoids sehr wahrscheinlich durch andere Mechanismen separiert wird<sup>[90,111,204]</sup>.

## 1.2 Der Z-Ring

Die Zytokinese ist der letzte Schritt des Zellzyklus, der zur Trennung einer Mutterzelle in zwei Tochterzellen führt. In eukaryotischen Organismen, wie z.B. tierischen, Hefe- und Pilzzellen wird die Zellteilung durch eine Struktur aus F-Aktin, Typ-II-Myosin und einigen weiteren Proteinen vermittelt, die längs zur Chromosomensegregationsachse einen kontraktilen Ring oder Gürtel ausbildet<sup>[156]</sup>. Die Positionierung dieses Teilungsapparates erfolgt durch unterschiedlichste Mechanismen, wie z.B. durch sogenannte *landmark*-Proteine in *S. cerevisiae* oder durch Signale vom mitotischen Apparat in tierischen Zellen<sup>[156]</sup>.

Im Gegensatz dazu wird in der großen Mehrheit der Bakterien sowie in Euryarchaeota und Chloroplasten die Zellteilung durch FtsZ vermittelt<sup>[1,130]</sup>. Bei diesem Protein handelt es sich um ein Tubulinhomolog<sup>[123]</sup>, das auf der Innenseite der Zytoplasmamembran eine ringähnliche Struktur, den Z-Ring, ausbildet. Dieser Ring ist das früheste zytologisch nachweisbare Ereignis während der bakteriellen Zellteilung<sup>[9]</sup>. FtsZ rekrutiert anschließend mehr als ein Dutzend weiterer Proteine zur Teilungsebene, um ein funktionelles Divisom auszubilden<sup>[62]</sup>. Zur Ausübung seiner Funktion in der Zellteilung polymerisiert FtsZ GTP-abhängig in kurze, 120 bis 200 nm lange<sup>[23,78,177]</sup> Protofilamente, welche drei Konformationen einnehmen können: gerade und leicht bzw. stark gekrümmt<sup>[124,139]</sup>. Neuere Erkenntnisse deuten auf eine überlappende, laterale Assoziation dieser kurzen Protofilamente hin<sup>[118]</sup>. Andererseits existieren ebenso experimentelle Hinweise auf eine longitudinale Anlagerung kurzer Filamente zu längeren Filamenten<sup>[24,139]</sup>. Unter anderem da die *in vivo*-Struktur des Z-Rings noch nicht endgültig aufgeklärt ist, ist auch der Prozess der Zellteilung an sich nicht im Detail verstanden. Es wurden jedoch Modelle aufgestellt, die zu erklären versuchen, wie FtsZ durch eine dynamische Reorganisation seiner Struktur die Zellteilung aktiv fördern könnte<sup>[2,48,159-160]</sup>.

Im Unterschied zu G-Proteinen, deren GTPase-Aktivität durch die Interaktion mit einem GTPase-aktivierenden Protein (GAP) induziert werden muss<sup>[12,207]</sup>, ist FtsZ, ähnlich wie Tubulin, eine selbstaktivierende GTPase<sup>[154,157]</sup>. Die Polymerisation von FtsZ zu Protofilamenten, in denen der C-Terminus des einen Monomers die N-terminale GTP-Bindetasche der benachbarten Untereinheit kontaktiert, induziert die GTP-Hydrolyse. Eine entscheidende Rolle kommt dabei der C-terminalen sogenannten T7-Schleife (auch als Synergie-Schleife bezeichnet) zu, die als GAP fungiert und die GTP-Hydrolyse in der assoziierten Untereinheit aktiviert<sup>[154,173,181]</sup>. Auf diese Weise induziert die Polymerisation von FtsZ dessen GTPase-Aktivität, so dass *in vitro* FtsZ-Polymere GTP und GDP in variierenden Verhältnissen enthalten<sup>[24,176]</sup>. Interessanterweise scheint die GTP-Hydrolyse durch FtsZ weder für die Assemblierung der Polymere<sup>[23,147]</sup>, noch für die Ausübung einer einschnürenden Kraft durch FtsZ nötig zu sein<sup>[34]</sup>. Stattdessen scheint ihre Rolle vielmehr darin zu bestehen, das Polymer zu destabilisieren und einen konstanten Austausch von FtsZ-Molekülen zwischen dem Protofilament und dem zytosolischen Pool zu erlauben<sup>[35,105]</sup>.



Übereinstimmend damit stellt der Z-Ring eine hochdynamische Struktur dar, in der mit einer Halbwertszeit von 8-9 Sekunden ein Austausch der Untereinheiten erfolgt<sup>[3,191]</sup>. Die Positionierung des Z-Rings und damit des Divisoms wird weitgehend durch negative regulatorische Mechanismen vermittelt, welche im Folgenden näher besprochen werden. Im Gegensatz zu bisherigen Annahmen kann die Positionierung von FtsZ jedoch auch einer positiven Kontrolle unterliegen, wie kürzlich anhand der Sporulation von *Streptomyces coelicolor* gezeigt wurde<sup>[212]</sup>.

## 1.3 Räumliche und zeitliche Regulation der Zellteilung

Der Z-Ring ist eine hochdynamische Struktur, welche die Zellteilung in einer Mehrzahl der prokaryotischen Organismen vermittelt<sup>[49]</sup>. Damit die Zytokinese in einer erfolgreichen Reproduktion der Mutterzelle resultiert, muss die Teilungsebene sowohl exakt positioniert als auch mit der Chromosomenreplikation und –segregation koordiniert werden. Andernfalls besteht die Gefahr der Zweiteilung des Chromosomes und damit der Bildung nicht lebensfähiger Nachkommen.

In den stäbchenförmigen Modellorganismen *E. coli* und *B. subtilis* sowie einer Vielzahl weiterer Bakterienarten erfolgt die räumliche und zeitliche Regulation der Zellteilung durch zwei sich gegenseitig ergänzende Mechanismen, nämlich das Min-System und *nucleoid occlusion* (NO). Zusammen begrenzen diese Systeme die Ausbildung des Z-Ringes auf die Zellmitte. Das Min-System verhindert dabei die Zellteilung an den Polen, wohingegen das NO-System die Teilung der Zelle über dem Nukleoid inhibiert<sup>[125]</sup>.

Es gibt jedoch auch zahlreiche Spezies, die weder Homologe des Min- noch des NO-Systems besitzen. Wie diese Bakterien ihre Teilungsebene positionieren, war lange Zeit unklar. Zu ihnen gehören z.B. *Clostridium glutamicum*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* und viele  $\alpha$ -Proteobakterien. Während für erstere die räumliche Regulation der FtsZ-Assemblierung immer noch weitgehend unklar ist, wurde in dem  $\alpha$ -Proteobakterium *C. crescentus* vor kurzem eine ATPase identifiziert, die diese Funktion übernimmt<sup>[200]</sup>.

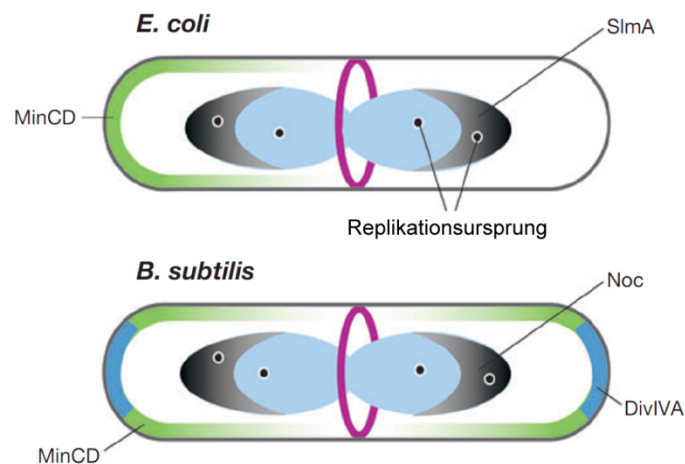
### 1.3.1 Das MinCD-System und *nucleoid occlusion* in *E. coli* und *B. subtilis*

Als Musterbeispiele für die Regulation der bakteriellen Zellteilung galten lange Zeit das Min System und *nucleoid occlusion* (NO) aus *E. coli* und *B. subtilis* (**Abbildung 1.3**). Letzteres verhindert die Ausbildung von Z-Ringen über dem Nukleoid und limitiert so theoretisch die Ausbildung einer Teilungsebene auf die Zellmitte und die Pole<sup>[213]</sup>. NO wird in *E. coli* und *B. subtilis* durch zwei miteinander nicht verwandte Proteine vermittelt: SlmA bzw. Noc<sup>[8,215]</sup>. Noc ist ein Homolog des Segregationsproteins ParB und bindet an palindromische Sequenzen, die mit Ausnahme der Terminusregion über das gesamte Chromosom verteilt sind und inhibiert so die Zytokinese über dem Chromosom<sup>[218]</sup>. SlmA ist ebenfalls ein DNA-Bindeprotein, welches ein ähnliches Verteilungsmuster wie Noc aufweist und direkt mit FtsZ interagiert<sup>[8,28]</sup>. Eine kürzlich veröffentlichte Studie demonstrierte ferner, dass ein DNA-gebundenes Dimer von SlmA gleichzeitig mit zwei FtsZ-Molekülen verschiedener Protofilamente interagiert und dadurch mit der Ausbildung höher geordneter FtsZ-Strukturen interferiert<sup>[203]</sup>. Für diese Aktivität von SlmA ist die GTPase-Aktivität von FtsZ essentiell<sup>[28]</sup>.

Der zweite Mechanismus, das Min-System, basiert auf der Aktivität der Schlüsselkomponenten MinCD. Die Deletion dieser Proteine resultiert sowohl in *E. coli* als auch *B. subtilis* in einer anormalen Positionierung des Teilungsapparates in der Nähe der Pole und damit in der Bildung von chromosomenfreien Minizellen<sup>[37,112]</sup>. In Kombination stellen das Min-System und NO sicher, dass sich der Z-Ring nur in der DNA-freien Region der Zellmitte und nach erfolgter Chromosomensegregation ausbildet. Die überlappenden Funktionen erklären auch, warum Zellen, die einen Defekt in nur einem der beiden Systeme aufweisen, immer noch lebensfähig sind, wohingegen die Deletion beider Systeme letal ist.

Das MinCD-System besteht zum einen aus dem Inhibitor der FtsZ-Assemblierung, MinC und zum anderen aus der membranassoziierten P-loop-ATPase MinD. MinD ist eng verwandt mit den an der DNA-Segregation beteiligten ParA-Proteinen<sup>[113]</sup>. In Analogie zur Assoziation von ParA-Proteinen mit DNA bindet MinD über eine C-terminale amphipathische Helix in Gegenwart von ATP kooperativ an die Zytoplasmamembran<sup>[73,193-194]</sup>. Durch die direkte Interaktion mit MinD wird anschließend MinC zur Membran rekrutiert und aktiviert<sup>[89]</sup>. MinC inhibiert die Zellteilung, indem es direkt mit FtsZ interagiert und wahrscheinlich die lateralen Interaktionen der FtsZ-Protofilamente inhibiert<sup>[33]</sup>. Die räumliche Aktivität des MinCD-Komplexes wird in *E. coli* durch den Topologiefaktor MinE reguliert. MinE konkurriert mit MinC um die Bindung an MinD, wodurch MinC effektiv aus dem Komplex mit MinD verdrängt wird<sup>[76,126,193]</sup>. MinE stimuliert ferner, ähnlich wie ParB-Proteine, die ATPase-Aktivität von MinD und führt so schließlich zu dessen Dissoziation von der Membran<sup>[102,223]</sup>. Nach Austausch von ADP gegen ATP beginnt MinD anschließend, an der Membran des gegenüberliegenden Pols erneut zu assemblieren, wo die MinE Konzentration am geringsten ist. Als Ergebnis zeigt MinD eine Pol-zu-Pol-Oszillation mit einer Periode von ca. 40 Sekunden<sup>[172]</sup>, die dazu führt, dass die Konzentration des MinCD-Komplexes im Zeitmittel an den Polen am höchsten und in der Zellmitte am geringsten ist und so die Ausbildung des Divisoms nur in der Zellmitte erfolgen kann. Interessanterweise kann die Selbstorganisation des *E. coli* Min-Systems *in vitro* rekonstituiert werden. Die einzigen Komponenten, die dazu benötigt werden, sind MinD, MinE, ATP und eine Phospholipidmembran<sup>[122]</sup>. Bisher ist nicht bekannt, warum MinD immer am gegenüberliegenden Zellpol assembliert, doch mathematische Modelle zeigen, dass eine Pol-zu-Pol-Oszillation dieses Typs ohne spezifische polare Nukleationsstellen generiert werden kann<sup>[77,101,137]</sup>.

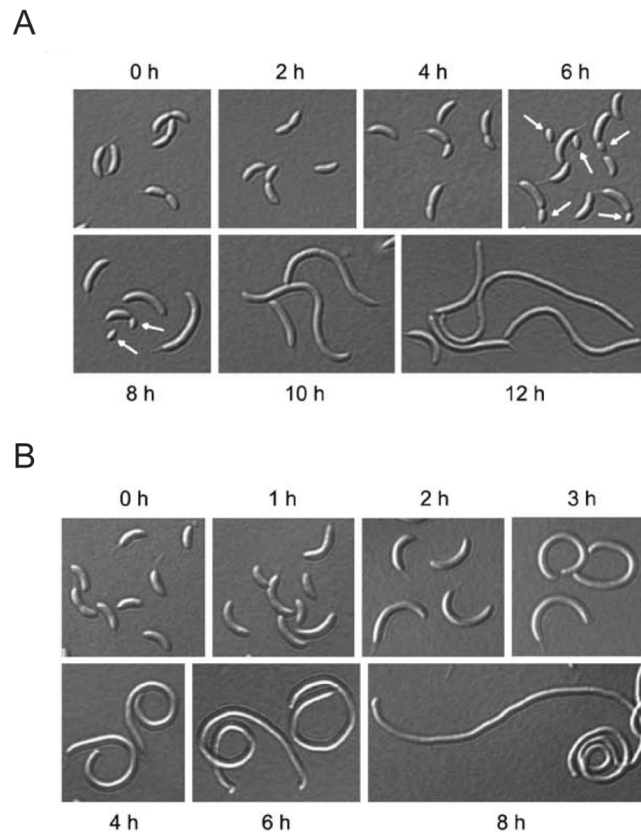
Im Gegensatz zur Situation in *E. coli* zeigt das MinCD-System in *B. subtilis* keine Oszillation, sondern wird vielmehr durch das membranbindende Protein DivIVA zu den Zellpolen rekrutiert<sup>[133]</sup> (**Abbildung 1.3**). Seit kurzem gibt es jedoch Hinweise darauf, dass der Komplex nicht statisch ist, sondern vielmehr dynamisch von den Polen zur Zellmitte lokalisiert, wo er nach erfolgter Separation eine erneute Zellteilung verhindert<sup>[64]</sup>. Somit scheint die primäre Funktion des MinCD-Systems in *B. subtilis* nicht darin zu bestehen, die Zellteilung an den Polen zu verhindern, wie das für das *E. coli* System der Fall ist, sondern vielmehr darin, eine Reinitiation der Zellteilung in unmittelbarer räumlicher Nähe zum zuletzt generierten Zellteilungsseptum zu inhibieren. Obwohl DivIVA nachweislich für die Lokalisation von MinCD an die Pole und die Teilungsebene nötig ist, konnte keine direkte Interaktion zwischen beiden Partnern nachgewiesen werden. Die mechanistische Verbindung wurde kürzlich durch die Entdeckung des Adapterproteins MinJ hergestellt, das die Lokalisation des MinCD-Komplexes zum polaren DivIVA-Komplex vermittelt<sup>[18,161]</sup>.



**Abbildung 1.3: Modelle für die Bestimmung der Teilungsebene in *E. coli* und *B. subtilis*.** Nähere Erläuterungen siehe Text (entnommen aus Ref.<sup>[125]</sup>).

### 1.3.2 Das MipZ System in *Caulobacter crescentus*

Im Gegensatz zu *E. coli* und *B. subtilis* besitzen *Caulobacter* und zahlreiche weitere  $\alpha$ -Proteobakterien weder das MinCD-System noch das NO System, um die Chromosomensegregation und Zellteilung räumlich zu koordinieren. Wie also wird in diesen Organismen die Teilungsebene positioniert? Kürzlich wurde, ausgehend von einer bioinformatischen Suche nach sowohl zellzyklusregulierten als auch in  $\alpha$ -Proteobakterien konservierten Genen<sup>[109]</sup>, das Protein MipZ identifiziert, das diese Funktion in *C. crescentus* erfüllt<sup>[200]</sup>. MipZ ist ein 278 Aminosäuren langes Protein mit einer molekularen Masse von 30,8 kDa, welches durch das Gen CC2165 kodiert wird<sup>[151]</sup>. Aufgrund des Vorhandenseins eines charakteristischen, abweichenden Walker A- und eines Walker B-Motivs in seiner N-terminalen Region kann das Proteins der Mrp/MinD-Familie von P-loop-ATPasen zugeordnet werden<sup>[113]</sup>. MipZ ist essentiell für die Lebensfähigkeit von *C. crescentus*. Seine Bedeutung für die Zellteilung wurde deutlich, als es aus den Zellen ausgedünnt bzw. in ihnen überproduziert wurde<sup>[200]</sup> (**Abbildung 1.4**). Eine konditionelle Deletionsmutante zeigt eine anormale Zellteilung. Die Teilungsebene ist dabei zum Schwärmerpol hin verschoben, so dass verlängerte Stielzellen und Mini-Schwärmerzellen gebildet werden, was schließlich zur Produktion von Zellen verschiedenster Länge führt (**Abbildung 1.4 A**). Im Gegensatz dazu resultiert die Überproduktion von MipZ von einem *high copy number*-Plasmid in einer fast sofortigen Blockade der Zellteilung und damit der Bildung langer, glatter Filamente (**Abbildung 1.4 B**). Beide Phänotypen sind auf die veränderte zelluläre MipZ-Konzentration zurückzuführen<sup>[200]</sup>.

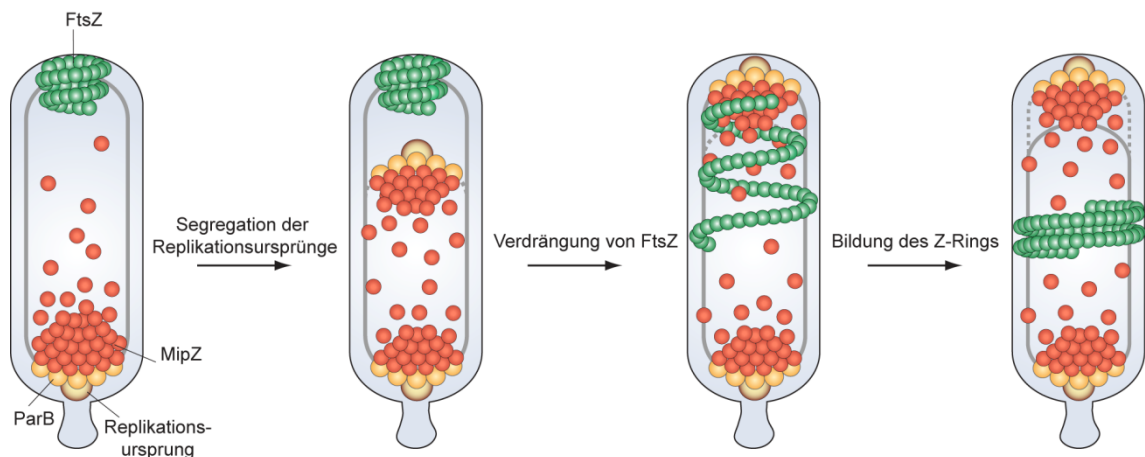


**Abbildung 1.4:** Effekt der (A) Ausdünnung bzw. (B) Überproduktion von MipZ auf die Morphologie von *C. crescentus* (entnommen aus Ref.<sup>[200]</sup>). Für eine genauere Beschreibung siehe Text.

Die Untersuchung der zellulären Verteilung von MipZ zeigt, dass dieses Protein in Schwärmerzellen am flagellierten Pol lokalisiert ist und nach Differenzierung in eine Stielzelle ein bipolares Lokalisationsmuster aufweist. Nach der Zellteilung entstehen so Schwärmerzellen, die einen MipZ-Fokus am flagellierten Pol aufweisen und Stielzellen, in denen MipZ am gestielten Pol lokalisiert ist. Damit entspricht die *in vivo* Dynamik von MipZ derjenigen des Replikationsursprungs (*Cori*)<sup>[88,208]</sup> (Abbildung 1.2 B) und des Chromosomensegregationsproteins ParB<sup>[52,140]</sup>. Tatsächlich wurde in weitergehenden Experimenten gezeigt, dass MipZ direkt mit ParB interagiert und auf diese Weise zu den Polen rekrutiert wird<sup>[200]</sup>.

Eine ausführliche zellbiologische und biochemische Analyse von MipZ verdeutlichte, dass die beobachteten Effekte der Depletion bzw. Überproduktion von MipZ auf einer Interaktion dieser ATPase mit dem Zellteilungsprotein FtsZ beruhen. Es wurde gezeigt, dass MipZ die Polymerisation von FtsZ inhibiert, indem es dessen GTPase-Aktivität stimuliert. Für diese Aktivität ist die Bindung von ATP durch MipZ erforderlich, nicht aber dessen Hydrolyse<sup>[200]</sup>. Dennoch ist die hydrolytische Aktivität von MipZ essentiell für seine *in vivo*-Funktion, denn eine Substitutionsvariante (D42A), die eine stark reduzierte ATP-Hydrolyserate aufweist, inhibiert die Zellteilung<sup>[200]</sup>.

Da MipZ die FtsZ-Polymerisation inhibiert, assembliert dieses immer an einer Position in der Zelle, die am weitesten von MipZ entfernt ist. In einer Zelle vor dem Eintritt in die S-Phase lokalisiert FtsZ am Pol gegenüber dem Stiel, während MipZ zusammen mit dem *parS*/ParB-Komplex am bestierten Pol zu finden ist (**Abbildung 1.5**). Nach Initiation der Replikation und Duplikation von *Cori* werden die Replikationsursprünge sofort durch ParB und MipZ gebunden. Einer der MipZ-*parS*/ParB-Komplexe bewegt sich innerhalb weniger Minuten bis zum gegenüberliegenden Pol. Dort interagiert MipZ mit FtsZ und als Resultat seiner inhibierenden Wirkung relokalisiert FtsZ von seiner polaren Position zur Zellmitte, wo es aufgrund der Abwesenheit von MipZ den charakteristischen Z-Ring ausbilden kann und damit die Zellteilung einleitet (**Abbildung 1.5**). Durch die Interaktion sowohl mit einem Zellteilungs- als auch einem Chromosomen-segregationsprotein koordiniert MipZ die Ausbildung des Z-Rings mit der Trennung der replizierten *Coris*. Zusätzliche Mechanismen, wie die zellzyklusabhängige Akkumulation von Komponenten des Teilungsapparates<sup>[108,134]</sup> und die Stimulation der FtsZ-Depolymerisation durch die bifunktionelle Oxidoreduktase KidO<sup>[170]</sup>, sind darüber hinaus an der zeitlichen Regulierung der Zytokinese beteiligt.



**Abbildung 1.5: Modell für die räumliche und zeitliche Regulation der Bildung des FtsZ-Rings durch MipZ** (modifiziert nach Ref.<sup>[200]</sup>). Für eine detaillierte Beschreibung siehe Text.

Interessanterweise bildet MipZ einen Konzentrationsgradienten aus, während ParB in einem distinkten, polaren Fokus lokalisiert<sup>[200]</sup> (**Abbildung 1.6**). Die Konzentration von MipZ weist zwar ebenfalls ein Maximum an den Zellpolen auf, nimmt aber anders als bei ParB zur Zellmitte hin kontinuierlich ab. Dadurch entsteht im Zentrum der Zelle ein definiertes Konzentrationsminimum von MipZ (**Abbildung 1.6**). MipZ liefert somit das erste Beispiel eines stabilen Konzentrationsgradienten in Bakterien.

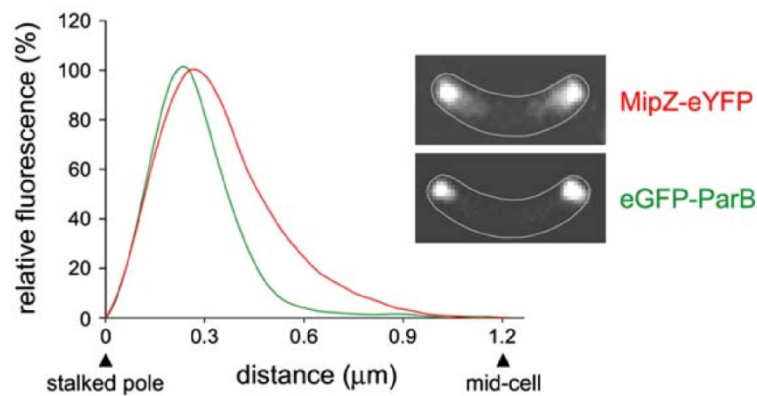


Abbildung 1.6: Fluoreszenzprofil von MipZ-YFP im Vergleich zu GFP-ParB (entnommen aus Ref.<sup>[200]</sup>).

## 1.4 Proteingradienten

Stabile Proteingradienten sind von zentraler Bedeutung für die Regulation zahlreicher biologischer Prozesse. Vor allem in multizellulären Organismen sind sie weit verbreitet. Zu den am besten untersuchten Beispielen gehören hierbei Konzentrationsgradienten sogenannter Morphogene. Dabei handelt es sich um sekretierte Signalmoleküle, die sich, ausgehend von einer lokalisierten Quelle wie z.B. einer definierten Gruppe von Zellen, in umgebende Bereiche ausbreiten<sup>[214]</sup>. Der resultierende räumliche Gradient, der durch eine Kombination aus Diffusion und Proteindegradation gebildet wird<sup>[211]</sup>, induziert konzentrationsabhängig die differentielle Expression von Zielgenen in benachbarten Zellen. Dadurch stellt der Morphogengradient räumliche Informationen bereit, welche wiederum in ein spezifisches Muster zellulärer Differenzierung translatiert werden. Auf diese Weise kontrollieren Morphogene die Gewebedifferenzierung und Morphogenese in multizellulären Organismen<sup>[10,25,39]</sup>.

In ähnlicher Weise sind auch intrazelluläre Protein- und Proteinphosphorylierungsgradienten von zentraler Bedeutung für die Organisation der eukaryotischen Zelle an sich. Hier sind sie unter anderem an der embryonalen Entwicklung und der Morphogenese der mitotischen Spindel beteiligt<sup>[93,152]</sup>. Darüber hinaus sind Phosphorylierungsgradienten ebenso in die Zellteilung involviert<sup>[55]</sup>. Ein Konzentrationsgradient des Polaritätsfaktors Pom1 in *Schizosaccharomyces pombe* koordiniert den Eintritt in die Mitose mit der Zellgröße<sup>[135,145]</sup>.

Während die Regulation zellulärer Prozesse durch Konzentrationsgradienten somit ein allgemeines Motiv eukaryotischer Systeme darstellt, sind gut charakterisierte Beispiele für diese Strategie einer Regulation in Prokaryoten immer noch selten. Lange Zeit galt die Annahme, dass stabile Proteingradienten in einer prokaryotischen Zelle nicht aufrechterhalten werden können. Aufgrund der geringen Dimensionen einer Bakterienzelle würde die Diffusion jeden Konzentrationsgradienten innerhalb weniger Sekunden eliminieren. Dennoch können stabile Proteingradienten auch in Bakterien ausgebildet werden, wie am Beispiel des Zellteilungsinhibitors MipZ in *C. crescentus* gezeigt wurde<sup>[200]</sup>. MipZ nutzt einen bipolaren Gradienten, um die Positionierung der Teilungsebene zu regulieren. Der dem Aufbau dieses Proteingradienten zugrundeliegende Mechanismus war zunächst jedoch noch nicht bekannt.

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

P-loop-ATPasen aus der Familie der Mrp/MinD-Proteine erfüllen eine Vielzahl zellulärer Funktionen<sup>[113]</sup>. Zu ihnen zählen ParA-Proteine, die an der Chromosomensegregation beteiligt sind sowie MinD, welches in zahlreichen Organismen den Z-Ring positioniert. Im Genom des Modellorganismus *C. crescentus* sind drei Proteine, die sich der Mrp/MinD-Familie zuordnen lassen, kodiert. Keines von ihnen ist ein MinD-Homolog. Stattdessen weisen die kodierten Proteine auf Sequenzebene größere Ähnlichkeit mit ParA-Proteinen auf. Eines von ihnen ist ein charakteristisches ParA-Protein, dessen Gen in einem Operon mit *parB* liegt und das an der Chromosomensegregation beteiligt ist<sup>[141]</sup>. Das zweite Protein, CC1537, wird unter Phosphatmangelbedingungen synthetisiert (J. Kühn, nicht veröffentlicht). An welchen zellulären Prozessen es beteiligt ist, ist jedoch noch unbekannt. Die Funktion des dritten ParA-ähnlichen Proteins, kodiert durch ORF *cc2165*, wurde durch Thanbichler und Shapiro<sup>[200]</sup> aufgeklärt. Dieses Protein übernimmt in *C. crescentus* eine ähnliche Funktion wie das MinCD-System in *E. coli* oder *B. subtilis*: Es koordiniert die räumliche Positionierung des Z-Rings in der Zellmitte mit der Chromosomensegregation und wurde deshalb MipZ (*midcell positioning of FtsZ*) genannt. MipZ formt einen einzigartigen Konzentrationsgradienten, mit Maxima an den Polen und einem definierten Minimum in der Zellmitte. Da MipZ ein Inhibitor der Z-Ring-Assemblierung ist, verhindert der MipZ-Gradient die Entstehung des Divisoms an den Polen, während er die Bildung des Z-Rings in der Mitte der Zelle zulässt. MipZ stellt das erste Beispiel eines stabilen Konzentrationsgradienten in einem prokaryotischen Organismus dar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung des der Gradientenbildung zugrundeliegenden Mechanismus. Vorangegangene Untersuchungen mit MipZ zeigten, dass die ATPase-Aktivität essentiell für dessen Funktion ist. Um die Rolle des ATPase-Zyklus für die Gradientenbildung zu analysieren, wurden fünf Varianten von MipZ mit Aminosäuresubstitutionen in der ATPase-Domäne auf ihre biochemischen und zellbiologischen Eigenschaften untersucht. Zur Unterstützung der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse wurden Kristallstrukturen von Wildtyp-MipZ sowie einer hydrolysebeeinträchtigten Variante herangezogen. Die abweichenden Charakteristika der Substitutionsvarianten im Vergleich zum Wildtyp-Protein wurden zur Aufstellung eines Modells genutzt, dass die Bildung des MipZ-Gradienten erklären kann. In einem zweiten Teil sollte der Versuch unternommen werden, mittels heterologer Expression von *mipZ* Homologen in *C. crescentus*, sowie einer anschließenden biochemischen Analyse von Substitutionsvarianten, Aminosäuren zu identifizieren, die an der Interaktion von MipZ mit seinen Bindepartnern beteiligt sind.





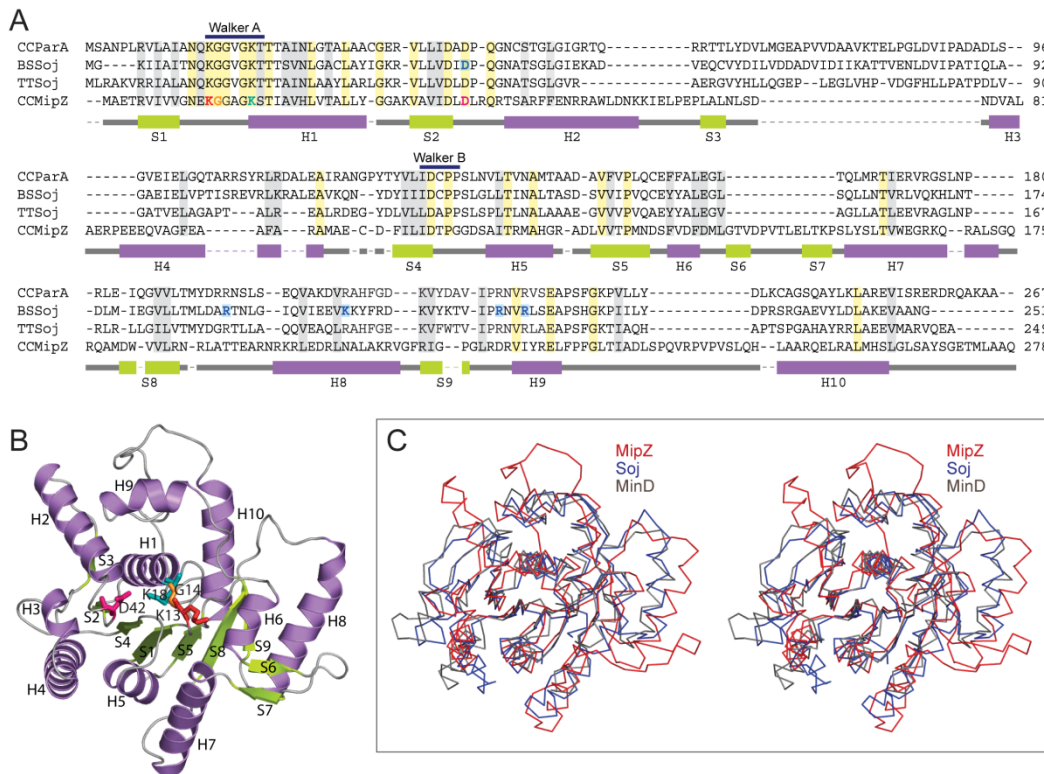
## 2 ERGEBNISSE

### 2.1 MipZ dimerisiert in Abhängigkeit von ATP

MipZ gehört zur Mrp/MinD-Familie von P-loop-ATPasen. Verschiedenste Mitglieder dieser Familie dimerisieren in Abhängigkeit von ATP und gehen dadurch in ihre biologisch aktivierte Form über<sup>[114,219]</sup>. Auch für MipZ konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der FtsZ-Polymerisation die Bindung von ATP, nicht aber dessen Hydrolyse erfordert<sup>[200]</sup>. Das lässt vermuten, dass MipZ ebenfalls eine Konfigurationsänderung als Folge der ATP-Bindung erfährt. Um zu überprüfen, ob MipZ tatsächlich ATP-abhängig dimerisiert, wurden zunächst die Struktur von Wildtyp (WT)-MipZ in der apo-Form und die der hydrolysebeeinträchtigten Variante D42A in Gegenwart von ATP $\gamma$ S gelöst. Zusammen mit einer bakteriellen Zwei-Hybrid-Analyse und verschiedenen *in vitro* Untersuchungen konnte auf diese Weise bestätigt werden, dass MipZ ATP-abhängig ein Dimer bildet und in Bezug auf dieses Merkmal ein typisches Mitglied der Mrp/MinD-Familie darstellt.

#### 2.1.1 Kristallstruktur von apo-MipZ

Die Kristallisation von MipZ in Abwesenheit von Nukleotiden erfolgte sowohl durch Katharine Michie in der Arbeitsgruppe von Jan Löwe (MRC, Cambridge, UK) (Kristallform 1) als auch durch Stephanie Wick in Kooperation mit Lars-Oliver Essen von der Philipps Universität Marburg (Kristallform 2). Die Struktur des apo-Proteins wurde so in einer Auflösung von 1,6 Å bzw. 1,8 Å gelöst (**Abbildung 2.1 B** und **Abbildung 2.2 C** und **Anhang A.3**). Beide Strukturen weisen mit einem RMSD (*root mean square deviation*)-Wert von 0,44 Å eine hohe Übereinstimmung auf. Apo-MipZ ist ein Monomer, dessen Kernstruktur der von Soj (PDB 1WCV) und MinD (PDB 1HYQ) ähnelt. Sie besteht aus einem Stapel von  $\beta$ -Faltblättern, der von  $\alpha$ -Helices umgeben ist. In Übereinstimmung mit ihrer strukturellen Ähnlichkeit lassen sich die Strukturen von MipZ, Soj und MinD gut aufeinander abbilden und weisen zudem eine signifikante Ähnlichkeit in der Nukleotidbinderegion auf (RMSD-Wert von 2,4 Å über 176  $\alpha$ -Kohlenstoffatome, die das Gerüst des konservierten Kerns bilden) (**Abbildung 2.1 C**). Jedoch weist MipZ auch einige strukturelle Unterschiede im Vergleich zu anderen P-loop-ATPasen wie Soj und MinD auf. So besitzt MipZ eine eindeutige Verlängerung der Helix 2 und zusätzlich eine große Schleife zwischen Helix 9 und Helix 10 (Helices 10 und 11 in Soj), die so in Soj oder MinD nicht zu finden ist. Darüber hinaus entsprechen Helices 6 und 7 in MipZ einer einzigen Helix sowohl in Soj als auch MinD. Am Übergang zwischen beiden Helices besitzt MipZ ein ungewöhnliches Strukturmotiv, bestehend aus einer großen Schleife, die durch ein kurzes anti-paralleles  $\beta$ -Faltblatt (S6/S7) stabilisiert wird. Damit weist MipZ charakteristische strukturelle Unterschiede zu verwandten P-loop-ATPasen der ParA/Soj- und MinD-Familien auf, was die in der Diskussion näher erläuterte Aussage unterstützt, dass MipZ-Homologe evolutionär eine eigene Familie bilden.



**Abbildung 2.1: Strukturelle Analyse von MipZ.** (A) Alignment der Primärsequenzen von *C. crescentus* MipZ (AAK24136) und ParA/Soj-Homologen aus *C. crescentus* (AAB51267), *B. subtilis* (CAB16134) und *T. thermophilus* (AAS81947). Ein 3D Strukturalignment von monomeren MipZ (PDB 2XJ4) und Soj (PDB 1WCV) wurde mit Hilfe von Superpose V1.0<sup>[127]</sup> erstellt. Die ParA/Soj-Sequenzen von *C. crescentus*, *B. subtilis* und *T. thermophilus* wurden mittels ClustalW<sup>[106]</sup> verglichen und anschließend manuell auf das Strukturalignment angepasst. Identische Aminosäurereste sind gelb, ähnliche sind grau hinterlegt. Konservierte Reste in der ATPase-Domäne von MipZ, die in dieser Arbeit mutiert wurden, sind in rot (K13), orange (G14), grün (K18) und magenta (D42) hervorgehoben. Reste, die in *B. subtilis* an der Interaktion mit DNA beteiligt sind<sup>[70]</sup>, sind blau markiert. Sekundärstrukturelemente von MipZ, bestimmt mit DSSP<sup>[91]</sup>, sind in lila ( $\alpha$ -Helices) und grün ( $\beta$ -Faltblatt) unter der Sequenz dargestellt. (B) Kristallstruktur von MipZ im nukleotidfreien, monomeren Zustand (Kristallform 1, PDB 2XJ4). Die Sekundärstrukturelemente und die in dieser Arbeit mutierten Reste in der ATPase-Domäne sind markiert. (C) Stereoverlagerung von MipZ (PDB 2XJ4) mit MinD aus *A. fulgidus* (PDB 1HYQ) und *T. thermophilus* Soj (PDB 1WCV), generiert mit Superpose V1.0. (von K. Michie, nicht veröffentlicht).

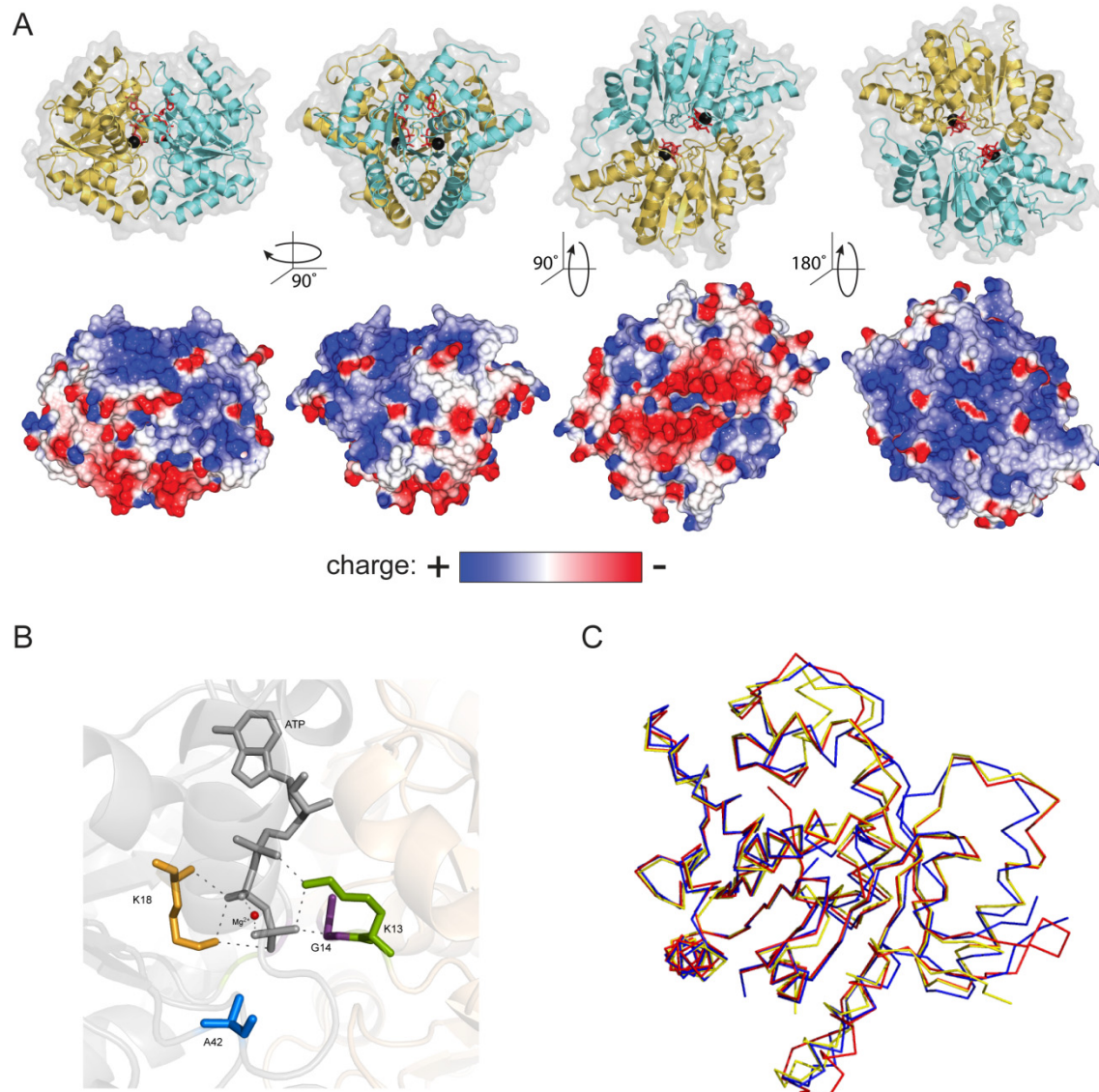
### 2.1.2 Kristallstruktur von MipZ<sub>D42A</sub> in Gegenwart von ATP $\gamma$ S

Eine frühere Studie an *T. thermophilus* Soj identifizierte eine Aminosäuresubstitution (D44A), die die ATP-Hydrolyse inhibiert und somit das Protein in seiner ATP-gebunden, dimeren Form arretiert<sup>[114]</sup>. Die Ähnlichkeit von MipZ mit ParA-Proteinen lies vermuten, dass eine äquivalente Mutation in MipZ (D42A) ebenfalls eine dimere Konformation stabilisieren könnte. Tatsächlich wurde die D42A-Variante von MipZ in Gegenwart von ATP $\gamma$ S durch Kate Michie und Jan Löwe (MRC, Cambridge, UK) als nukleotidgebundenes Dimer mit einer Auflösung von 2,8 Å kristallisiert (PDB 2XJ9; **Abbildung 2.2** und **Anhang A.3**). Ähnlich zu anderen ATPasen aus der Mrp/MinD-Familie<sup>[114,182,219]</sup> bildet MipZ ein „Nukleotidsandwich“, in dem die ATP-Bindedomänen der beiden Monomere den Kern der Dimerengrenzfläche bilden (**Abbildung 2.2 A**). Das MipZ Dimer weist einen zentralen Spalt auf, der entlang der Grenzfläche zwischen beiden Untereinheiten bis zu den Nukleotidbindestellen verläuft, wobei sich am Ende dieses Spaltes die Phosphate der beiden gebundenen Nukleotide befinden.

Eine Poisson-Boltzmann-Analyse des elektrostatischen Oberflächenpotentials zeigte, dass die Öffnung dieses Spaltes stark negativ geladen ist (**Abbildung 2.2 A** untere Reihe, zweites Bild von rechts). Dagegen ist die Oberflächenladung des MipZ-Dimers gegenüber der Spalte stark positiv. Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen an Soj, bei dem zwei von hydrophoben Resten umgebene Spalten auf gegenüberliegenden Seiten des Dimers zu finden sind<sup>[114]</sup>.

Das Dimer wird durch zahlreiche Reste stabilisiert, die Wasserstoffbrückenbindungen mit dem durch die andere Untereinheit gebundenen Nukleotid eingehen. Zu diesen Resten gehören auch zwei stark konservierte Aminosäuren der Walker A-Box der ATP-Bindedomäne (**Abbildung 2.2 B**). Ein Aminosäurerest ist das sogenannte „Signaturlysin“ an Position 13 (K13), welches ein spezifisches Merkmal von Mitgliedern der Mrp/MinD-Familie darstellt<sup>[113]</sup>. Es kontaktiert die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Phosphate des mit der benachbarten Untereinheit assoziierten ATP und scheint so eine Schlüsselrolle sowohl bei der ATP-Hydrolyse als auch der ATP-abhängigen Dimerisierung zu spielen. Das  $\gamma$ -Phosphat wird zusätzlich durch den hochkonservierten Glycinrest an Position 14 (G14) der benachbarten Untereinheit stabilisiert. Dagegen ist ein weiterer Lysinrest im P-loop, K18, von entscheidender Bedeutung für die ATP-Bindung durch ein Monomer. Dieser Rest interagiert über seine  $\epsilon$ - und  $\alpha$ -Aminogruppe mit den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphaten des ATP derselben Untereinheit und erfüllt so eine bedeutende Funktion bei der Nukleotidbindung. In dem für die Kristallisation verwendeten Protein ist der hochkonservierte Aspartatrest D42 durch Alanin substituiert. Die Struktur des Dimers weist an dieser Stelle in Richtung des mit dem ATP assoziierten  $Mg^{2+}$  eine Lücke auf. Das lässt vermuten, dass die Seitenkette dieses Aspartats an der Koordination des  $Mg^{2+}$  und des angreifenden Nukleophils beteiligt und somit entscheidend für den katalytischen Prozess der ATP-Hydrolyse ist. Zusammenfassend deuten die zahlreichen intermolekularen Kontakte zwischen dem ATP-Molekül der einen Untereinheit und Resten der anderen Untereinheit darauf hin, dass die Bindung von ATP kritisch für die Dimerisierung ist. Unterstützt wird diese Annahme einer direkten, adaptorähnlichen Funktion des Nukleotids bei der Dimerisierung dadurch, dass MipZ nur geringfügige strukturelle Änderungen beim Übergang von der apo-Form in die ATP-gebundene Form erfährt (**Abbildung 2.2 C**; RMSD von 0,76 Å). Die meisten Änderungen treten in Regionen auf, die direkt an der Dimerisierung beteiligt sind, besonders dem P-loop, dem Abschnitt zwischen  $\beta$ -Strang 5 und Helix 6, sowie den ersten Resten von Helix 8.

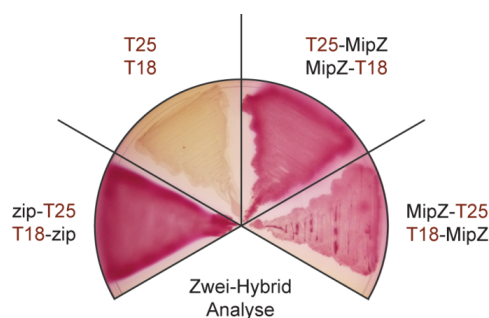
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Struktur von MipZ in Bezug auf den zentralen Stapel aus  $\beta$ -Faltblättern, die von  $\alpha$ -Helices umgeben sind, derjenigen anderer P-loop-ATPasen wie Soj, MinD und NifH ähnelt<sup>[114,182,219]</sup>. Darüber hinaus wird auch bei MipZ die ATP-Bindedomäne durch Reste aus einer zweiten Untereinheit komplettiert, so dass die ATP-abhängige Dimerisierung eine Voraussetzung für die ATP-Hydrolyse dazustellen scheint. Charakteristische, strukturelle Unterschiede zu den zuvor genannten P-loop-ATPasen weisen MipZ jedoch gleichzeitig als Begründer einer eigenen Familie aus.



**Abbildung 2.2: Strukturelle Analyse von MipZ<sub>D42A</sub>.** **(A)** Kristallstruktur von MipZ<sub>D42A</sub> in der ATP<sub>γ</sub>S-gebundenen, dimeren Form (PDB 2XJ9). Zu sehen sind die Anordnung von Sekundärstrukturelementen (oben) und das elektrostatische Oberflächenpotential innerhalb eines Bereichs von  $\pm 0,3$  V, bestimmt mittels CCP4mg<sup>[164]</sup> (unten). **(B)** Interaktion konservierter Reste der ATP-Bindedomäne mit dem an eine Untereinheit gebundenen ATP. Die beiden Monomere des Dimers sind transparent grau bzw. orange dargestellt. **(C)** Überlagerung der Strukturen von monomerem und dimerem MipZ. Zu sehen ist das Gerüst der MipZ Monomere in der Kristallform 1 (PDB 2XJ4, rot) und Kristallform 2 (PDB 2XIT, gelb) sowie die Untereinheit A des MipZ<sub>D42A</sub> Dimers (PDB 2XJ9, blau). (K. Michie, nicht veröffentlicht)

### 2.1.3 ATP-Bindung ist eine Voraussetzung für die Dimerisierung

Die Kristallstruktur von MipZ lässt vermuten, dass MipZ ATP-abhängig dimerisiert. Um diese Annahme näher zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt die Selbstinteraktion von WT-MipZ *in vivo* mittels eines bakteriellen Zwei-Hybrid Systems analysiert<sup>[95]</sup>. Hierzu wurden Fusionen von MipZ sowohl an das T18- als auch an das T25-Fragment der Adenylatzyklase von *Bordetella pertussis* im *E. coli*-Reporterstamm BTH101 (*cya*) koproduziert und die Zellen auf McConkey Indikatormedium gezogen (**Abbildung 2.3**). Eine Selbstinteraktion von MipZ würde in der Rekonstitution einer funktionellen Adenylatzyklase resultieren, welche über den cAMP/CAP-Weg den Abbau von Maltose induzieren würde, sichtbar an einer Rotfärbung der Kolonien. Tatsächlich färbten sich Kolonien, die MipZ-Fusionen an die zwei Fragmente der Adenylatzyklase kotsynthetisierten, rot (**Abbildung 2.3**), während Zellen, die nur eine MipZ-Fusion zusammen mit dem komplementären zweiten Fragment der Adenylatzyklase produzierten, weiße Kolonien bildeten (Daten nicht gezeigt). Somit zeigt das bakterielle Zwei-Hybrid-System, dass MipZ-Moleküle *in vivo* tatsächlich miteinander interagieren können.

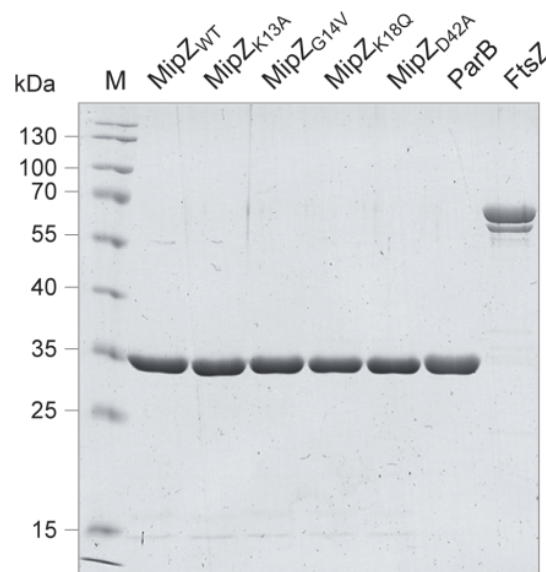


**Abbildung 2.3: Detektion der MipZ-Selbstinteraktion durch Bakterien Zwei-Hybrid-Analyse.** Der Reporterstamm *E. coli* BTH101 (*cya*) wurde mit zwei Plasmiden kotransformiert, die Fusionen von MipZ an das T18- und T25-Fragment der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* kodieren. Transformanten wurden auf McConkey Indikatorplatten ausgestrichen. Eine Interaktion zwischen MipZ-Molekülen rekonstituierte die Adenylatcyclase, sichtbar an einer Rotfärbung der Kolonien. Als Positivkontrolle wurden Fusionen an die Leucinzipperregion des GCN4 Proteins aus *S. cerevisiae* verwendet (zip).

Um die Nukleotidabhängigkeit der Dimerisation näher zu untersuchen, wurden vier hochkonservierte Reste in der ATP-Bindedomäne mutiert (siehe **Abbildung 2.2 B**). Die ersten drei Mutationen betreffen Aminosäuren in der Walker A Box, auch P-loop genannt (zusammengefasst bezeichnet als P-loop-Varianten von MipZ). Aus der Kristallstruktur des D42A-Dimers ist ersichtlich, dass diese Reste an der Interaktion mit ATP beteiligt sind. Der erste Aminosäureaustausch, K13A, ersetzte das Signaturlysin K13 durch Alanin, und sollte sowohl die Dimerisierung als auch die ATP-Hydrolyse beeinträchtigen. Die zweite Substitution, von G14 durch ein Valin (G14V), resultiert wahrscheinlich in einer sterischen Behinderung der Dimerisierung aufgrund der großen Seitenkette des Valins<sup>[114]</sup>. Eine dritte Mutation, K18Q, beeinträchtigt vermutlich die ATP-Bindung und damit ebenfalls die Dimerisierung. Es wurde bereits gezeigt, dass die letzte Substitution, D42A, in einer reduzierten ATP-Hydrolyserate resultiert<sup>[200]</sup>.



Durch die Koordination des Nukleophils ist dieser Aspartatrest essentiell für die katalytische Aktivität verwandter Proteine<sup>[114,182]</sup>, hat voraussichtlich aber keinen Einfluss auf die ATP-Bindung oder Dimerisierung, da dieser Rest aufgrund seiner strukturellen Position an keinem der beiden Schritte direkt beteiligt zu sein scheint. Alle mutierten Proteine, sowie WT-MipZ, wurden heterolog in *E. coli* synthetisiert und als Fusionsproteine mit einem C-terminalen Hexahistidinaffinitätspeptid (His<sub>6</sub>) gereinigt (**Abbildung 2.4**). *Caulobacter*-Zellen, die MipZ-His<sub>6</sub> anstelle von WT-MipZ exprimierten, wiesen weder einen Wachstumsdefekt noch eine veränderte Morphologie auf (Daten nicht gezeigt), so dass davon auszugehen ist, dass die Histidinreste die Funktionalität des Proteins nicht beeinträchtigen.



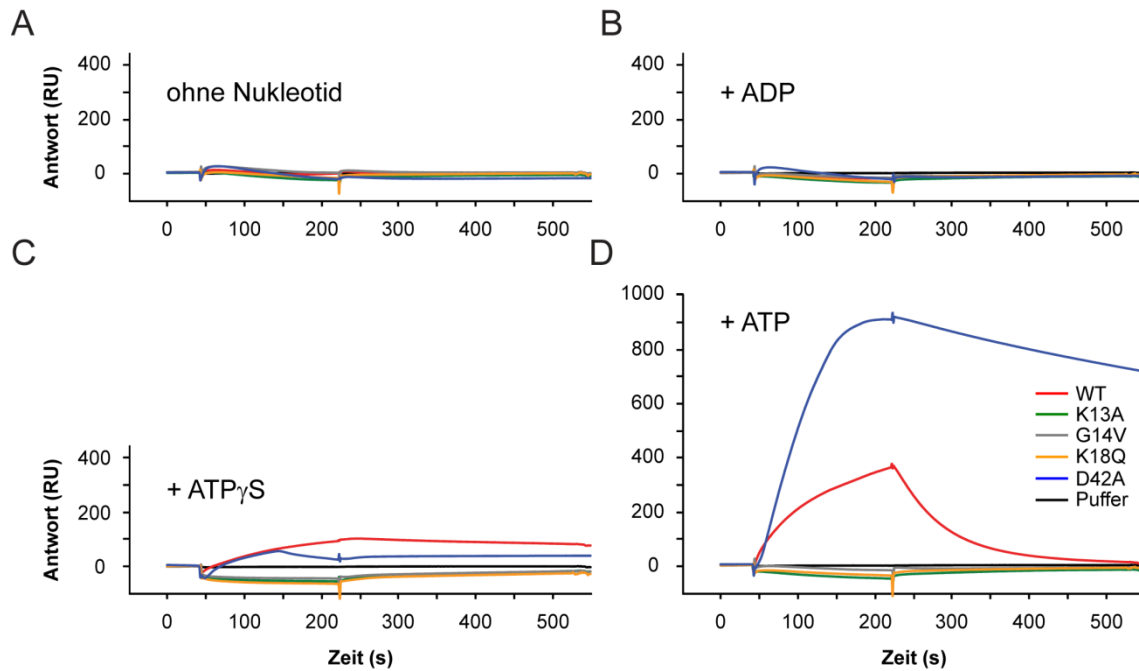
**Abbildung 2.4: Gereinigte Proteine für biochemische Analysen.** Je 3 µg der nach der Reinigung erhaltenen Proteinlösungen wurden auf ein 11 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie-Blau gefärbt.

Die Fähigkeit der verschiedenen MipZ-Proteine, mit sich selbst zu interagieren, wurde mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) untersucht.

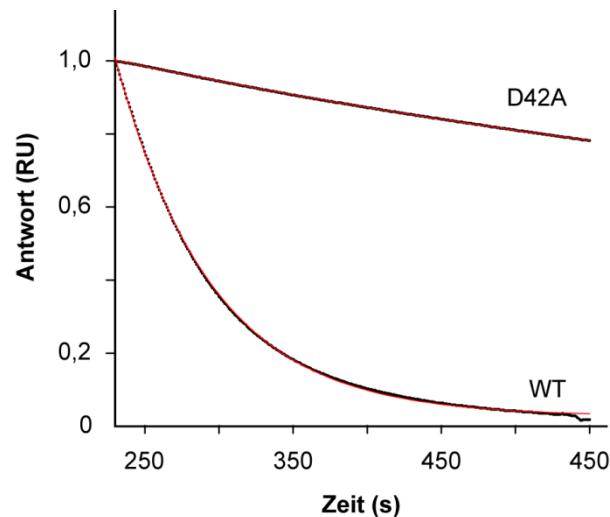
Die SPR-Analyse ist eine weitverbreitete Technik zur Interaktionsanalyse von Biomolekülen und beruht auf einem quantenphysikalischen Phänomen an einem Sensorchip. Dieser Chip ist mit einem dünnen Goldfilm beschichtet, welcher wiederum auf verschiedenste Weise modifiziert werden kann, um einen Bindepartner (Ligand) auf der Oberfläche zu immobilisieren. Die Oberfläche des Chips steht in direktem Kontakt zu einem Flusskanal, über den der zweite Bindepartner, der Analyt, in einem Pufferstrom an die Oberfläche transportiert wird. Die Goldschicht sowie die Chipoberfläche mit dem Flusskanal stellen dabei zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices dar. Wird polarisiertes Licht in einem bestimmten Winkel auf die Goldschicht gestrahlt, wird dieses an der Grenzschicht zu dem zweiten Medium total reflektiert. Bei einer bestimmten Kombination aus Einstrahlwinkel und Energie regt das Licht sogenannte „Plasmons“ (SPR) in der Goldschicht an, wodurch eine charakteristische Resonanzabsorption der Energie des eingestrahnten Photons induziert wird. Das Resultat ist eine Intensitätsminderung des reflektierten Lichts. Die Bedingungen, die SPR hervorrufen, sind sehr empfindlich gegenüber dem

Brechungsindex an der Goldoberfläche. Biomolekulare Wechselwirkungen an der Chipoberfläche führen jedoch zu Konzentrationsänderungen des Analyten und somit auch zu Änderungen des Brechungsindex des Mediums an dieser Grenzfläche. Dies wiederum verändert den Einstrahlwinkel des Lichts bei dem SPR auftritt, und diese Änderung wird als *resonance units* (RU) gemessen. Somit ist die SPR-Antwort proportional zu der an der Chipoberfläche gebundenen Analytmenge.

Um nun die Selbstinteraktion der verschiedenen MipZ-Proteine zu untersuchen, wurden diese zunächst über ihre Aminogruppen kovalent an die Carboxydextran-Oberfläche eines CM5-Chips gebunden. Anschließend wurde die Nukleotidabhängigkeit der Homodimerisierung analysiert, indem nicht-immobilisiertes Protein ohne Nukleotid oder in Gegenwart von ADP, ATP $\gamma$ S bzw. ATP über die Chipoberfläche geschickt wurde (**Abbildung 2.5**). Wie bereits aufgrund der Kristallstrukturdaten vermutet, war eine Selbstinteraktion von WT-MipZ nur in Gegenwart von ATP und seinem langsam hydrolysierbarem Analogon ATP $\gamma$ S zu beobachten (**Abbildung 2.5 C und D**). Die Dimerisierung von WT-MipZ in Gegenwart von ATP ist gekennzeichnet durch eine schnelle Assoziations- (*on*-Rate) sowie Dissoziationsrate (*off*-Rate). Interessanterweise ist die Antwort in Anwesenheit von ATP $\gamma$ S deutlich geringer, d.h. weniger MipZ Moleküle in Lösung binden an die immobilisierten Moleküle. Die Ursache dafür könnte im experimentellen Ablauf liegen. ATP $\gamma$ S wurde mit dem Protein gemischt, bevor beide Komponenten zusammen an die Chipoberfläche transportiert wurden. Dadurch lagen eventuell schon zahlreiche MipZ-Moleküle in der Lösung als Dimere vor und konnten somit nicht mehr mit dem immobilisierten Protein interagieren. Ferner ist anzumerken, dass die Dissoziation der Proteine von der Oberfläche nach Ende der Injektion mit ATP $\gamma$ S sehr viel langsamer erfolgte als in Gegenwart von ATP. Das lässt vermuten, dass der Dimerzerfall mit der ATP-Hydrolyse gekoppelt ist. Unterstützt wird diese Annahme durch das Dissoziationsverhalten der hydrolysebeeinträchtigten D42A-Variante, welche ebenfalls eine ATP-abhängige Selbstinteraktion zeigte (**Abbildung 2.5 D**). Die Ablösung dieses Proteins von der Chipoberfläche war im Vergleich zu WT-MipZ deutlich verlangsamt. Mehr noch, nähert man die Dissoziationsphase in Gegenwart von ATP mit einer einfach-exponentiellen Funktion an, so ergibt sich daraus für WT-MipZ eine Geschwindigkeitskonstante  $k$  von  $0,011\text{ s}^{-1}$  bzw.  $0,001\text{ s}^{-1}$  für die D42A-Variante (**Abbildung 2.6**). Diese um den Faktor zehn verlangsamte Dissoziation des D42A-Proteins korreliert sehr gut mit der ebenfalls etwa zehnfach reduzierten ATPase-Aktivität dieser Substitutionsmutante im Vergleich zum WT-Protein<sup>[200]</sup>. Zusammen mit der drastisch verlangsamen Dissoziation in Gegenwart von ATP $\gamma$ S lässt sich daraus schlussfolgern, dass der Zerfall des Dimers mit der ATP-Hydrolyse assoziiert ist. Gleichzeitig lässt dies vermuten, dass die D42A-Variante ein stabileres Dimer bildet als WT-MipZ. Unterstützt wird diese Annahme durch die etwa 2,5-fach höhere Antwort der D42A-Variante im Vergleich zum WT-Protein: wenn die Assoziationsrate gleich bleibt, die Dissoziationsrate aber verlangsamt ist, binden in einem definierten Zeitraum mehr Moleküle an die Oberfläche und die Antwort steigt. Wie bereits aufgrund der Kristallstrukturdaten vermutet, waren die P-loop-Varianten nicht mehr zur Selbstinteraktion befähigt (**Abbildung 2.5**). Zusätzlich wird diese Beobachtung durch eine Arbeit an Soj unterstützt, die zeigt, dass äquivalente Mutationen zu G14V und K18Q die Selbstassoziation in Gegenwart von ATP verhindern<sup>[114]</sup>. Ob dieser Effekt auf einer beeinträchtigten ATP-Bindung beruht, war zunächst noch unklar.



**Abbildung 2.5: Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse der Homodimerisierung der verschiedenen MipZ Varianten.** Die gereinigten Proteine wurden auf einem CM5-chip immobilisiert ( $\sim 3500$  RU) und anschließend das immobilisierte MipZ-Protein ( $6 \mu\text{M}$ ) als Analyt **(A)** in Abwesenheit von Nukleotiden, **(B)** in Gegenwart von  $1 \text{ mM}$  ADP, **(C)** in Gegenwart von  $1 \text{ mM}$   $\text{ATP}\gamma\text{S}$  und **(D)** in Gegenwart von  $1 \text{ mM}$  ATP über die modifizierte Oberfläche geschickt.



**Abbildung 2.6: Zerfall des WT- und D42A-MipZ-Dimers.** Dargestellt sind die Dissoziationsphasen in Gegenwart von ATP für WT-MipZ und dessen D42A-Variante für das unter Abbildung 2.5 D beschriebene SPR-Experiment. Die roten Kurven sind durch eine einfache exponentielle Kurve definiert, aus der sich eine Geschwindigkeitskonstante für den Dimerzerfall von  $0,011 \text{ s}^{-1}$  (WT) bzw.  $0,001 \text{ s}^{-1}$  (D42A) ergibt.



## 2.2 Der Nukleotidaustausch durch MipZ kann spontan erfolgen

### 2.2.1 Analyse der Nukleotidbindung mittels Stopped-Flow

Um zu testen, ob die Unfähigkeit der P-loop-Varianten, mit sich selbst zu interagieren, auf einer beeinträchtigten ATP-Bindung beruht, wurde die Nukleotidbindung zunächst mittels der Stopped-Flow-Methode untersucht. Diese Technik ermöglicht Aussagen über die Kinetik der Assoziations- und Dissoziationsphase einer biomolekularen Interaktion. Hierbei werden zwei Lösungen, die z.B. Protein und Ligand enthalten, unter hohem Druck in einer Küvette gemischt. Die Ausbildung des Komplexes wird über die Änderung eines Signals verfolgt. In der Regel wird dazu die intrinsische Fluoreszenz der Tryptophan-Reste des Proteins ausgenutzt. Eine weitere Möglichkeit besteht z.B. in der Modifikation des Liganden mit einer fluoreszierenden Gruppe. Als Folge der Interaktion zwischen Protein und Ligand ändert sich die direkte molekulare Umgebung der angeregten Gruppe, was eine Zu- oder Abnahme des gemessenen Fluoreszenzsignals zur Folge hat. Diese Änderung kann in Echtzeit verfolgt werden, um im Anschluss mittels Regressionsanalyse die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen zu bestimmen.

MipZ besitzt drei Tryptophane, deren Fluoreszenzspektrum durch die Nukleotidbindung jedoch nicht beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die kinetischen Messungen mit modifizierten Nukleotiden durchgeführt, die eine fluoreszierende Methylantraniloyl-Gruppe (mant-Gruppe), angefügt an die 2'-oder 3'-Hydroxygruppe der Riboseeinheit, trugen. Da diese Hydroxylgruppen von Resten in der benachbarten Untereinheit kontaktiert werden (S136 und D136) und somit an der Dimerisierung beteiligt sind und die mant-Gruppe darüber hinaus sehr groß ist, können Monomere, die mant-modifizierte Nukleotide gebunden haben, nicht mehr mit anderen Monomeren assoziieren. Übereinstimmend damit wurde weder eine Selbstinteraktion von MipZ in Gegenwart von mant-ATP mittels SPR, noch eine Hydrolyse dieses ATP-Analogons durch MipZ beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dadurch war es möglich, spezifisch die Nukleotidbindung an ein Monomer zu messen.

In der vorliegenden Arbeit verwendete Nukleotidanaloga waren mant-ADP, mant-ATP sowie mant-ATP $\gamma$ S. Die Fluoreszenz der Reportergruppe lässt sich durch Exzitation mit Licht einer Wellenlänge von 355 nm und durch Messung der Emission bei 448 nm verfolgen. Da durch direkte Anregung der mant-Gruppe das Hintergrundsignal sehr stark zunimmt, ihr Exzitationsspektrum gleichzeitig aber mit dem Emissionsspektrum der Tryptophan-Reste ( $\lambda_{\text{max}} = 350\text{-}360\text{ nm}$ ) überlappt, wurden alle Messungen im Fluoreszenzresonanztransfer-Modus (FRET) durchgeführt. Das bedeutet, die Fluoreszenz der mant-Gruppe wurde nicht direkt angeregt, sondern die Exzitation erfolgte stattdessen durch Weiterleitung der Anregungsenergie von den Tryptophanresten. Auf diese Weise sollten vorrangig gebundene Nukleotide Fluoreszenzlicht emittieren, was zu einer Reduktion des Hintergrundsignals führte. Die Fluoreszenz der mant-Gruppe nahm durch Interaktion mit den MipZ-Proteinen stark zu, so dass die Assoziationsphase für alle drei Nukleotide sehr gut verfolgt werden konnte. Eine typische Transiente, die nach Mischen von MipZ mit mant-ATP erhalten wurde, ist in **Abbildung 2.7 A** gezeigt.

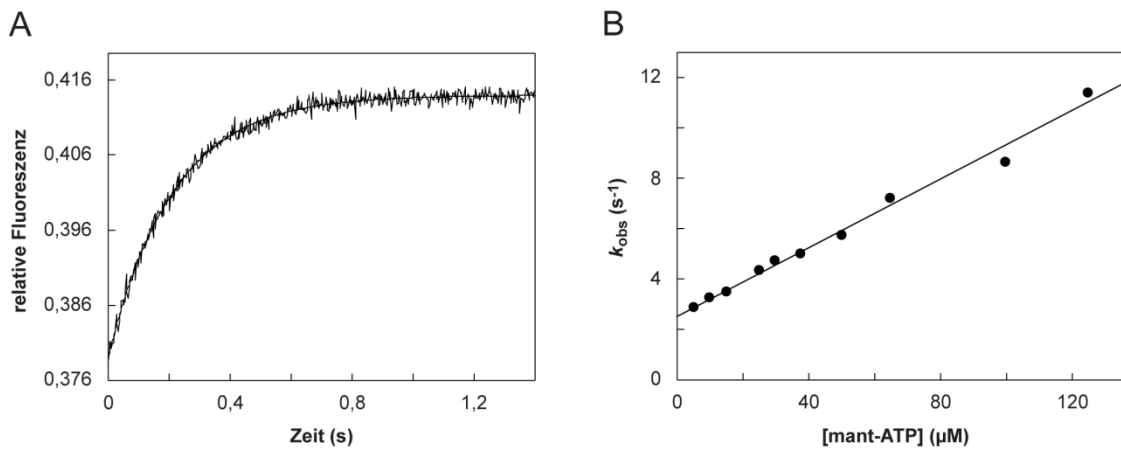
Da die Reaktion unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung stattfand ( $c_{\text{mant-ATP}} \gg c_{\text{MipZ}}$ ), konnte die Kurve durch eine einfach-exponentielle Funktion der Form

$$F(t) = F_{\text{max}} - F_{\text{max}}e^{-kt} + C \quad (1)$$

beschrieben werden.  $F$  ist dabei die gemessene Fluoreszenz zum Zeitpunkt  $t$ ,  $F_{\text{max}}$  die maximale Änderung der Fluoreszenz,  $k$  die beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Reaktion und  $C$  die Fluoreszenz zum Zeitpunkt  $t=0$ . Durch nicht-lineare Regressionsanalyse lässt sich im vorliegenden Beispiel eine Geschwindigkeitskonstante von  $k = 4,7 \text{ s}^{-1}$  ermitteln. Eine Erhöhung der mant-ATP Konzentration bei konstanter MipZ-Konzentration resultierte in einem linearen Anstieg der Geschwindigkeitskonstante (**Abbildung 2.7 B**). Das spricht für einen einfachen Bindungsmechanismus, bestehend aus einem einzelnen Schritt. Die lineare Abhängigkeit beider Größen kann für die hier vorliegende Reaktion durch folgende Gleichung dargestellt werden:

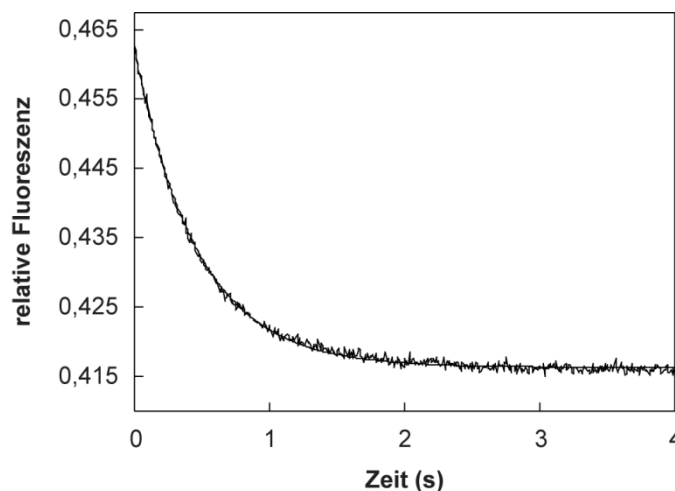
$$k = k_{\text{ass}}[\text{mant} - \text{ATP}] + k_{\text{diss}} \quad (2)$$

wobei  $k_{\text{ass}}$  die Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion und  $k_{\text{diss}}$  die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion beschreibt. Somit entspricht die Steigung einer durch die Messpunkte gelegten Ausgleichsgeraden der Assoziationskonstante  $k_{\text{ass}}$  der Reaktion. Im vorliegenden Fall beträgt sie  $6,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Die Dissoziationskonstante  $k_{\text{diss}}$  ist durch den Schnittpunkt mit der y-Achse gegeben und wurde mit  $2,5 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. In **Tabelle 2.1** sind alle auf diese Weise ermittelten Konstanten für die Interaktion von sowohl WT-MipZ als auch seiner Varianten mit mant-Nukleotiden aufgelistet. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die  $k_{\text{ass}}$ -Werte nur geringfügig in Abhängigkeit vom verwendeten Nukleotid und der analysierten Proteinvariante ändern.



**Abbildung 2.7: Assoziation von MipZ mit mant-ATP. (A)** Transiente der mit dem Stopped-Flow-Gerät gemessenen Bindung von mant-ATP (30 µM) an MipZ (1 µM). Die Fluoreszenz wurde im FRET-Modus detektiert. Die schwarze Linie entspricht einer einfachen exponentiellen Funktion mit einer Geschwindigkeitskonstanten von  $k = 4,7 \text{ s}^{-1}$ . **(B)** Änderung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung ( $k_{\text{obs}}$ ) als Funktion der mant-ATP Konzentration. Aus der Ausgleichsgeraden ergeben sich  $k_{\text{ass}} = 6,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und  $k_{\text{diss}} = 2,5 \text{ s}^{-1}$ .

Zur direkten und damit exakteren Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziationsreaktion wurde ein Verdrängungsexperiment durchgeführt. Dazu wurde ein Komplex aus MipZ und mant-ATP mit einem Überschuss an ATP gemischt. Mant-ATP Moleküle, die von MipZ dissoziierten, wurden in diesem Fall sofort durch nichtmarkiertes ATP ersetzt. Der mehr als 60-fache Überschuss an ATP gegenüber mant-ATP verhinderte eine erneute Bindung des mant-ATP an MipZ und die Dissoziationsreaktion konnte somit als Verringerung der mant-Fluoreszenz zeitlich verfolgt werden (**Abbildung 2.8**). Die erhaltene Transiente kann ebenfalls durch eine einfach-exponentielle Funktion beschrieben werden. Da die Dissoziationsreaktion konzentrationsunabhängig ist und damit eine Reaktion nullter Ordnung darstellt, entspricht hier die beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k$  der Dissoziationskonstanten  $k_{\text{diss}}$ . Sie wurde nach nicht-linearer Regressionsanalyse mit einem Wert von  $2,1 \text{ s}^{-1}$  (siehe auch **Tabelle 2.1**) bestimmt und entspricht damit der zuvor indirekt aus den Experimenten zur Assoziationsreaktion abgeleiteten Dissoziationskonstante. **Tabelle 2.1** listet die Konstanten für alle untersuchten Interaktionen. Generell sind die gemessenen Dissoziationsraten schnell, vor allem im Vergleich zu G-Proteinen. GTPasen, wie z.B. Ras und Rho besitzen eine um ca. vier bis fünf Größenordnungen langsamere Dissoziationsrate für GDP<sup>[46,54]</sup>. Für eine effektive Nukleotidaustauschrate besitzen diese Proteine sogenannte Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEF), Proteine, die die Dissoziation von GDP um einen Faktor von fünf stimulieren können. Im Komplex mit ihrem GEF tauschen diese GTPasen GDP ähnlich schnell aus wie MipZ. Somit scheint ein analoger Austauschfaktor für MipZ nicht nötig zu sein.



**Abbildung 2.8: Dissoziation des mant-ATP von MipZ.** Ein Komplex aus mant-ATP ( $30 \mu\text{M}$ ) und MipZ ( $1 \mu\text{M}$ ) wurde mit einem Überschuss an nichtmarkiertem ATP ( $1 \text{ mM}$ ) gemischt. Die Dissoziation des mant-ATP von MipZ wurde über eine Abnahme der mant-Fluoreszenz verfolgt. Die schwarze Linie entspricht einer einfachen exponentiellen Funktion mit einer Geschwindigkeitskonstanten von  $k_{\text{diss}} = 2,1 \text{ s}^{-1}$ .

**Tabelle 2.1:** Biochemische Parameter der Nukleotidbindung

Protein	$k_{\text{ass}}$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{diss}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>
<b>mant-ATP</b>			
WT	$6,8 * 10^4$	2,1	31
K13A	$5,6 * 10^4$	2,1	38
G14V	$15,7 * 10^4$	0,2	1,3
K18Q	$6,2 * 10^4$	7,5	121
D42A	$7,8 * 10^4$	4,5	58
<b>mant-ADP</b>			
WT	$11,8 * 10^4$	3,1	26
K13A	$8,6 * 10^4$	3,5	41
G14V	$20,5 * 10^4$	0,9	4,5
K18Q	NB <sup>c</sup>	NB <sup>c</sup>	NB <sup>c</sup>
D42A	$5,5 * 10^4$	3,8	69
<b>mant-ATP<math>\gamma</math>S</b>			
WT	$8,7 * 10^4$	3,7	42
<b>ATP</b>			
G14V	$1,3 * 10^4$	0,2	11
<b>ADP</b>			
G14V	$2,0 * 10^4$	0,1	6

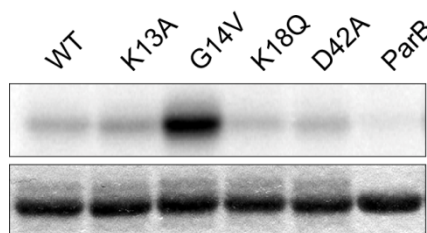
<sup>a</sup> gemessen mittels eines Verdrängungsexperimentes<sup>b</sup> aus Geschwindigkeitskonstanten hergeleitet ( $K_D = k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$ )<sup>c</sup> nicht bestimmbar

Mit Hilfe der Assoziations- und Dissoziationskonstanten konnte die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  über die Relation  $K_D = k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$  bestimmt werden (**Tabelle 2.1**). MipZ zeigt dabei vergleichbare, relativ geringe Affinitäten sowohl für mant-ATP als auch für mant-ADP ( $K_D \sim 30 \mu\text{M}$ ). Der  $K_D$ -Wert für die Interaktion mit mant-ATP $\gamma$ S ist mit  $42 \mu\text{M}$  sehr ähnlich. Die geringe Affinität im mikromolaren Bereich sowie die schnellen Dissoziationsraten bedeuten, dass der Nukleotidaustausch spontan erfolgen kann und damit die Notwendigkeit für einen Austauschfaktor, wie für GTPasen und ParA beschrieben<sup>[41,81]</sup>, nicht gegeben ist. Wie erwartet, wiesen die K13A- und D42A-Variante ähnliche Bindungseigenschaften wie das WT-Protein auf. Dem gegenüber reduzierte die K18Q-Mutation die Affinität von MipZ für ATP um das Vierfache und verhinderte die Messung einer ADP-Bindung. Interessanterweise zeigte die G14V-Variante eine stark erhöhte Affinität für mant-Nukleotide. Eine mögliche Ursache mag in einer Konformationsänderung des P-loops liegen, die durch eine Umorientierung des Valinrestes hin zur Proteinoberfläche induziert wurde, um den Kontakt dieses hydrophoben Restes mit der hydrophilen Umgebung zu minimieren.

Da die Affinität der G14V-Mutante für mant-Nukleotide um das Zehnfache höher war als die von WT-MipZ, konnte für dieses Protein auch die Affinität für nichtmarkiertes ATP und ADP bestimmt werden. Die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation wurde wie zuvor beschrieben bestimmt, mit der Änderung, dass G14V ( $1 \mu\text{M}$ ) mit ADP bzw. ATP ( $7,5 \mu\text{M}$ ) vorinkubiert und anschließend mit dem entsprechenden mant-Nukleotid ( $5 \text{ mM}$ ) gemischt wurde.

Die aus diesen Experimenten erhaltenen Geschwindigkeitsraten sind nicht nur sehr ähnlich zueinander, sondern auch zu den Dissoziationsraten für die mant-Nukleotide (**Tabelle 2.1**). Die Bestimmung der Assoziationskonstante erfolgte für nichtmarkierte Nukleotide mit Hilfe eines Konkurrenzexperiments. Die G14V-Variante ( $1\ \mu\text{M}$ ) wurde dazu mit einer konstanten Konzentration mant-ATP bzw. -ADP ( $30\ \mu\text{M}$ ) und variierenden Konzentrationen an ATP bzw. ADP ( $0 - 120\ \mu\text{M}$ ) gemischt, so dass ATP mit steigenden Konzentrationen zunehmend mit mant-ATP um die Bindung an das Protein konkurriert und damit die gemessene mant-Fluoreszenz abnahm. Eine Regressionsanalyse der auf diese Weise erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung ergab eine Assoziationskonstante zweiter Ordnung von  $1,3 \cdot 10^4\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$  bzw.  $2,0 \cdot 10^4\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$  für ATP bzw. ADP (**Tabelle 2.1**). Die resultierenden Gleichgewichtsdissoziationskonstanten waren zueinander sehr ähnlich ( $K_D \approx 6-11\ \mu\text{M}$ ). Für ATP war der erhaltene  $K_D$ -Wert jedoch fast eine Zehnerpotenz höher als für das entsprechende mant-Nukleotid. Dies mag darin begründet sein, dass die mant-Gruppe zusätzliche Bindestellen bereitstellt, mit denen Aminosäurereste interagieren können, wodurch die Affinität zunimmt.

In einem zweiten Ansatz wurde die Interaktion der verschiedenen MipZ-Proteine und radioaktiv markiertem ATP mittels UV-crosslinking untersucht (**Abbildung 2.9**). Das Ergebnis unterstützt die Stopped-Flow-Daten, denn hier zeigte die G14V-Variante ebenfalls ein deutlich stärkeres Signal als WT-MipZ, wohingegen die K18Q-Variante durch ein schwächeres Signal gekennzeichnet war.



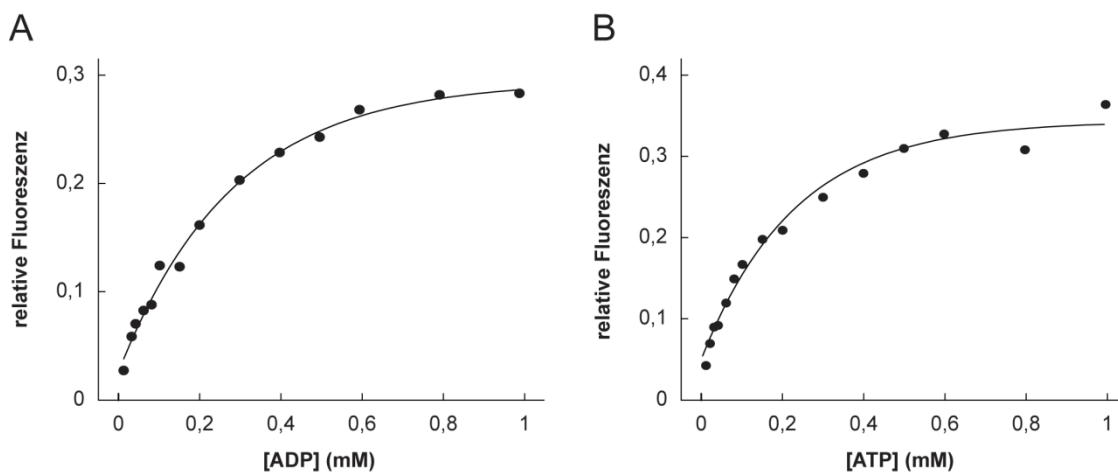
**Abbildung 2.9: UV-crosslinking der verschiedenen MipZ-Proteine mit radioaktiv markiertem ATP.** MipZ ( $7,7\ \mu\text{M}$ ) und  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  ( $0,33\ \mu\text{M}$ ) wurden für 10 min bei  $30\ ^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend für 5 min mit UV-Licht ( $254\ \text{nm}$ ) vernetzt. Nach Separation der Vernetzungsprodukte von freiem ATP in einer SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Coomassie-Färbung (untere Reihe) und die radioaktiven Signale mittels Autoradiographie (obere Reihe) detektiert.

### 2.2.2 Analyse der Nukleotidbindung mittels Gleichgewichtsmessungen

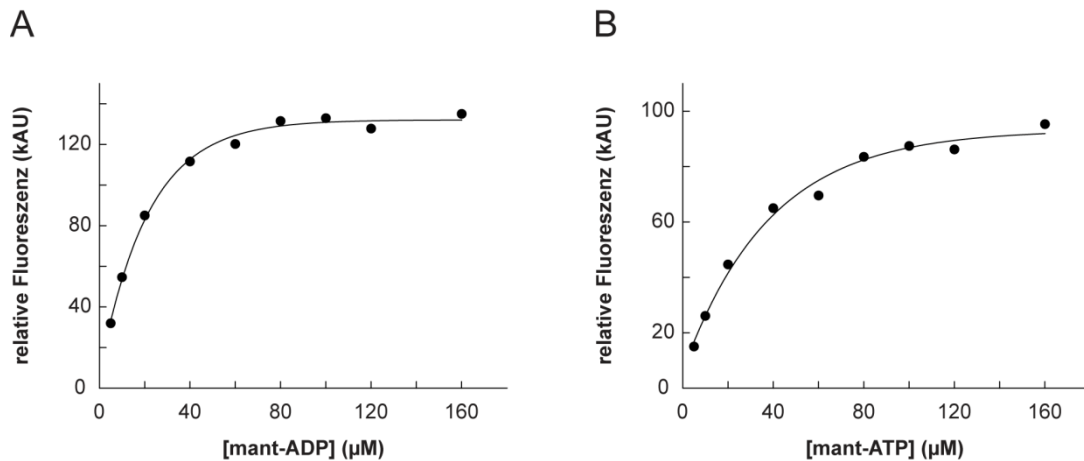
Aufgrund der geringen Affinität von MipZ für mant-ATP und -ADP war es nicht möglich, mittels der Stopped-Flow-Methode analog die Affinitäten für ATP und ADP zu bestimmen. So muss zum Beispiel für die Ermittlung der Dissoziationsrate das Protein zunächst mit ATP bzw. ADP gesättigt werden, um dann durch einen Überschuss an entsprechendem mant-Nukleotid verdrängt zu werden. Dies ist experimentell jedoch nicht umzusetzen, da hierfür einerseits große Mengen an mant-Nukleotid nötig sind, andererseits die Hintergrundfluoreszenz zu groß wird. Um zu untersuchen, ob die Affinität von WT-MipZ für nichtmarkierte Nukleotide ähnlich zu denen für mant-Nukleotide ist, wurde die Interaktion von MipZ mit ATP bzw. ADP in Konkurrenz mit ANS (8-Anilino-1-naphthalensäure) unter Gleichgewichtsbedingungen untersucht. Für ANS ist bekannt, dass es an hydrophobe Regionen eines Proteins bindet<sup>[66,192]</sup> und auch mit Nukleotidbindestellen eines Proteins interagiert<sup>[136,209-210]</sup>.

Die Bindung von ANS an das Protein resultiert zum einen in einer Zunahme und zum anderen in einer Blauverschiebung der Fluoreszenz, wohingegen ANS in einer polaren Umgebung nur schwach fluoresziert.

Zur Bestimmung der Affinität für ATP bzw. ADP wurden 2  $\mu\text{M}$  MipZ in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  ANS mit steigenden Konzentrationen ATP bzw. ADP titriert. Die Abnahme der ANS-Fluoreszenz wurde im Vergleich zu einer Kontrolltitration ohne Nukleotid gemessen (**Abbildung 2.10**). Die visuelle Beurteilung der Fluoreszenzabnahme ergab, dass das Signal durch ATP und ADP ungefähr gleich schnell reduziert wurde, was auf einen ähnlichen  $K_D$  hindeutet. Durch Einpassen einer exponentiellen Kurve in die Daten lässt sich der  $K_D$  genauer abschätzen. Er betrug 168  $\mu\text{M}$  bzw. 121  $\mu\text{M}$  für ADP bzw. ATP. Diese Werte liegen um etwa das 5-fache über denen, die für mant-ATP und -ADP gemessen worden waren. Gleichzeitig ergab eine Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für die mant-Nukleotide mittels Fluoreszenztitration ähnliche Werte wie die Stopped-Flow Messungen, so dass das Ergebnis der Gleichgewichtstitration als zuverlässig anzusehen ist (**Abbildung 2.11**). Eine Kontrolltitration mit BSA anstelle von MipZ zeigte, dass das Signal sowohl mit ATP als auch Puffer als Titrant gleich schnell abnahm, was darauf hinweist, dass ATP im Fall von MipZ tatsächlich ANS von der Nukleotidbindestelle verdrängt (Daten nicht gezeigt). Die Abwesenheit der mant-Gruppe, die zusätzliche Bindestellen für MipZ bereitstellt, könnte die geringere Affinität von MipZ für nichtmarkierte Nukleotide erklären. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass MipZ ähnliche und im Gegensatz zur Interaktion von GTPasen mit GTP und GDP geringere Affinitäten für ATP und ADP besitzt, so dass der Nukleotidaustausch ohne Austauschfaktor spontan erfolgen kann.



**Abbildung 2.10: Gleichgewichtsmessung der Interaktion von MipZ mit ADP und ATP in Konkurrenz mit ANS.** 2  $\mu\text{M}$  MipZ wurden mit 100  $\mu\text{M}$  ANS inkubiert und die Änderung des Fluoreszenzsignals von ANS durch steigende Konzentrationen an (A) ADP und (B) ATP im Messansatz gemessen. Die schwarzen Kurven sind durch eine einfache exponentielle Funktion definiert, aus der sich eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante von 168  $\mu\text{M}$  für die Interaktion mit ADP und von 121  $\mu\text{M}$  für die Interaktion mit ATP ergibt.

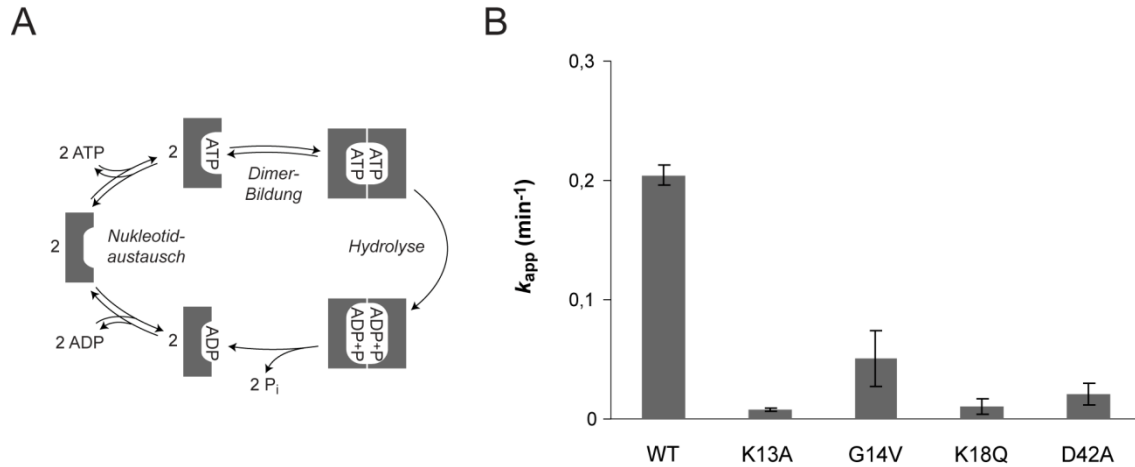


**Abbildung 2.11: Gleichgewichtsmessung der Interaktion von MipZ mit mant-ADP und mant-ATP.** MipZ (1 μM) wurde mit steigenden Konzentrationen an (A) mant-ADP bzw. (B) mant-ATP titriert und die Änderung der mant-Fluoreszenz verfolgt. Alle Messpunkte stellen um eine Kontrolltitration ohne Protein korrigierte Werte dar. Die schwarze Kurve repräsentiert eine einfache exponentielle Funktion, aus der ein  $K_D$  für die Interaktion von MipZ mit mant-ADP (14 μM) und mant-ATP (24 μM) abgeleitet wurde.

## 2.3 Die biologisch aktive Form von MipZ ist das Dimer

Es konnte gezeigt werden, dass die K18Q-Variante eine stark verringerte Affinität zu ATP hat und deshalb auch keine Dimerisierung mehr möglich ist. Im Gegensatz dazu binden die beiden Substitutionsmutanten G14V und K13A ATP ähnlich dem WT, sind jedoch nicht mehr in der Lage zu dimerisieren. Unterstützt wird diese Beobachtung durch die Kristallstruktur der D42A-Variante, die zeigt, dass diese Reste keine Bedeutung für die ATP-Bindung in derselben Untereinheit haben, wohl aber das ATP der benachbarten Untereinheit stabilisieren und damit direkt an der Dimerisierung beteiligt sind. Die D42A-Substitution dagegen beeinflusst die Fähigkeit zur Dimerbildung nicht. Die Position dieses Restes im Kristall sowie Studien an anderen P-loop-ATPasen zeigen, dass der Aspartatrest vielmehr eine entscheidende Rolle bei der ATP-Hydrolyse spielt, indem er das Wassermolekül koordiniert, das den nukleophilen Angriff auf das  $\gamma$ -Phosphat ausübt<sup>[182]</sup>.

Da die ATP-Hydrolyse eine entscheidende Rolle für die Funktion von MipZ spielt<sup>[200]</sup>, wurde die intrinsische ATPase-Aktivität aller mutierten Proteine mittels der Hydrolyse radioaktiven ATPs bei sättigenden Nukleotidkonzentrationen bestimmt (**Abbildung 2.12 B**). WT-MipZ besitzt mit einer gemessenen ATP-Hydrolyserate ( $k_{app}$ ) von  $0,2 \text{ min}^{-1}$  eine geringe intrinsische Aktivität. Die Substitution von Aminosäuren im P-loop resultierte in einer signifikanten Verringerung der ATP-Hydrolyserate (G14V) oder in einem Verlust der Aktivität (K13A, K18Q) (**Abbildung 2.12 B**). Da diese Substitutionsvarianten immer noch in der Lage sind, Nukleotide, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität (siehe **Tabelle 2.1**), zu binden, beruht der beobachtete Effekt in der ATPase-Aktivität somit auf der behinderten Dimerisierung der P-loop-Varianten. Im Gegensatz dazu führt die D42A-Substitution zu einer 10-fach geringeren enzymatischen Aktivität und arretiert das Protein in der ATP-gebundenen, dimeren Form. Die Tatsache, dass die ATP-Hydrolyse durch diese Mutation in MipZ, anders als im Fall äquivalenter Mutationen in anderen P-loop-ATPasen<sup>[114]</sup>, nicht vollständig eliminiert wurde, lässt vermuten, dass hier noch weitere Reste an dem katalytischen Mechanismus beteiligt sind.



**Abbildung 2.12: ATPase-Aktivität der MipZ-Proteine.** (A) ATPase-Zyklus von MipZ. Nach Bindung von ATP bilden zwei Monomere ein Dimer. Die Dimerisierung vervollständigt das katalytische Zentrum von MipZ und induziert so die ATP-Hydrolyse. Die Spaltung der Phosphodiesterbindung destabilisiert den dimeren Komplex und resultiert in der Dissoziation der zwei Untereinheiten und Freisetzung von P<sub>i</sub>. Die zwei ADP-gebundenen Monomere erfahren einen spontanen Nukleotidaustausch und der Zyklus beginnt von vorn. (B) Intrinsische ATPase-Aktivität. Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität ( $k_{app}$ ) wurden 6  $\mu$ M Protein mit 1 mM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP inkubiert und die gebildete Menge an [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ADP pro Minute und eingesetzter Proteinkonzentration ermittelt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen ( $\pm$  SD).

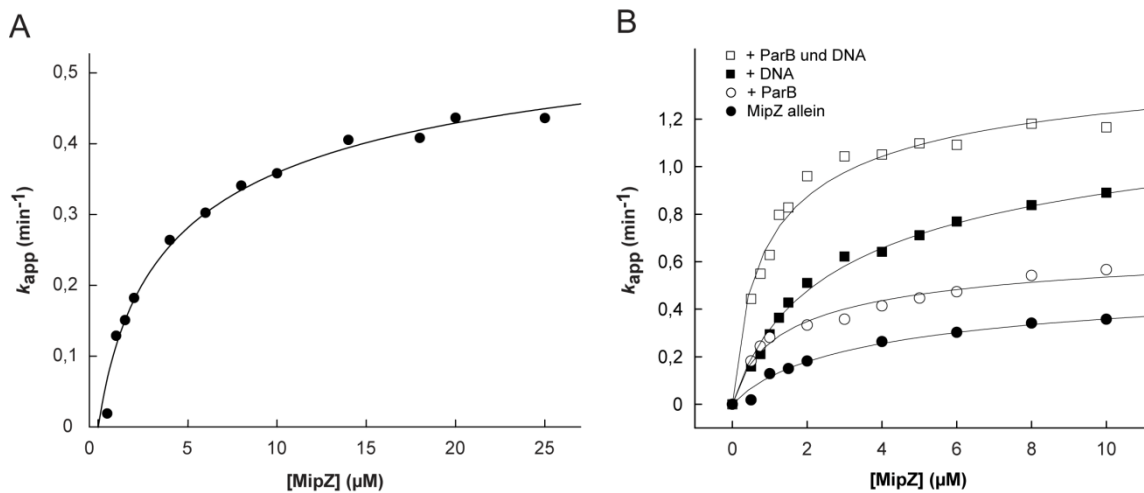
Wie bereits erwähnt, behindern Mutationen im P-loop sowohl die Dimerisierung von MipZ als auch die ATP-Hydrolyse. Somit scheint nur der dimere Komplex aus zwei ATP-gebundenen Untereinheiten katalytisch aktiv zu sein (Abbildung 2.12 A). Ist diese Annahme korrekt, sollte die spezifische ATPase-Aktivität von MipZ vom Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren abhängen. Die Lage dieses Gleichgewichts wiederum wird durch die Gesamtkonzentration an MipZ bestimmt. Tatsächlich konnte festgestellt werden, dass die hydrolytische Aktivität von MipZ in einer verdünnten Lösung drastisch reduziert ist, also unter Bedingungen, bei denen nur ein geringer Anteil an MipZ-Molekülen als Dimer vorliegt (Abbildung 2.13 A). Eine Erhöhung der Proteinkonzentration resultierte in einer Zunahme der hydrolytischen Aktivität, bis diese schließlich eine Sättigung erreichte. Dies spiegelt eine Situation wider, in der alle MipZ-Moleküle in der aktiven, dimeren Form vorliegen, so dass eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration keinen Einfluss auf die ATP-Hydrolyserate hat. Ausgehend von der Vermutung, dass die hydrolytische Aktivität tatsächlich mit der Anzahl an Dimeren in einer Population von MipZ-Molekülen korreliert und dass Monomere praktisch ausschließlich in der ATP-gebundenen Form vorliegen, sollte die hydrolytische Aktivität  $k_{app}$  in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration nachstehender Gleichung folgen:

$$k_{app} = 2k_{cat} \frac{[MM]}{[M_t]} = 2k_{cat} \left( \frac{1}{2} + \frac{K_D - \sqrt{8[M_t]K_D + K_D^2}}{8[M_t]} \right) \quad (3)$$

wobei  $k_{cat}$  die katalytische Aktivität des MipZ-Dimers,  $[MM]$  die Dimerkonzentration,  $[M_t]$  die Gesamtkonzentration an MipZ und  $K_D$  die Gleichgewichtsdissociationskonstante des Dimers beschreibt (zur Herleitung siehe **Appendix A.4**). Eine Regressionsanalyse der Daten zeigte, dass sich die ATP-Hydrolyserate exakt wie durch das Modell vorhergesagt änderte, wobei sich ein Wert



für  $k_{\text{cat}}$  von  $0,67 \text{ min}^{-1}$  und  $8 \mu\text{M}$  für  $K_D$  ergab (**Abbildung 2.13 A**). Diese Ergebnisse bestätigen, dass MipZ, ähnlich wie andere P-loop-ATPasen der Mrp/MinD-Familie<sup>[41,114,184]</sup>, eine eher moderate ATP-Hydrolyserate besitzt, welche von der Proteinkonzentration und damit auch von der Dimerisierung abhängt. Darüber hinaus unterstützt dieses Experiment die Ergebnisse aus der Biosensor-Analyse zur Dimerisierung von MipZ. Dort dissoziierte der Komplex an der Oberfläche des Chips mit einer Rate von  $0,011 \text{ s}^{-1}$  (**Abbildung 2.6**). Das entspricht exakt der katalytischen Aktivität von WT-MipZ und zeigt, dass der Zerfall des Dimers mit der ATP-Hydrolyse gekoppelt ist.



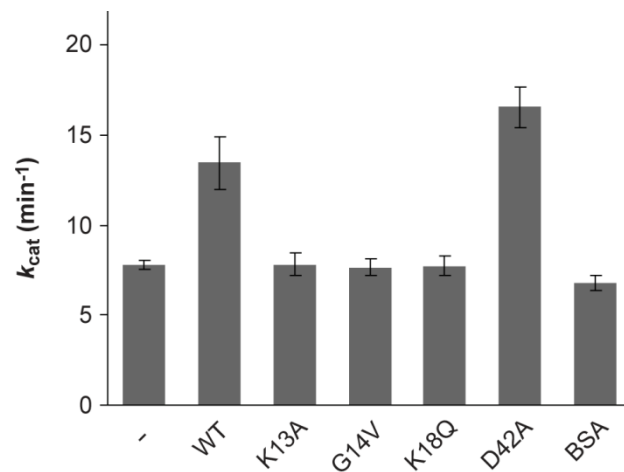
**Abbildung 2.13: Konzentrationsabhängigkeit der ATPase-Aktivität von MipZ.** (A) Die hydrolytische Aktivität  $k_{\text{app}}$  von MipZ für verschiedene Proteinkonzentrationen wurde in Gegenwart von  $2 \text{ mM}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  bestimmt. Die Beschreibung der Daten durch ein Modell, dass  $k_{\text{app}}$  in Relation zur Dimerkonzentration setzt (siehe Text), ergab eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  für den dimeren Komplex von  $8 \mu\text{M}$  und einen Wert von  $0,67 \text{ min}^{-1}$  für die katalytische Aktivität ( $k_{\text{cat}}$ ). Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen. (B) Abhängigkeit der hydrolytischen Aktivität von MipZ von der Anwesenheit von ParB und DNA im Messansatz. Die Reaktionsansätze enthielten die angegebenen Konzentrationen an MipZ,  $2 \text{ mM}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  und zusätzlich entweder ParB ( $4,5 \mu\text{M}$ ), Plasmid-DNA (pMT428;  $0,21 \mu\text{M}$ ) oder ParB + Plasmid-DNA ( $4,5$  bzw.  $0,21 \mu\text{M}$ ). Die eingepassten Kurven beschreiben die Daten durch das unter (A) und im Text beschriebene Modell. Die Daten für MipZ allein stellen einen Ausschnitt des unter (A) beschriebenen Experiments dar und erscheinen hier zum Zweck einer besseren Vergleichbarkeit der Experimente.

MipZ interagiert mit ParB und wird dadurch zu den Polen rekrutiert<sup>[200]</sup>. Ein weiterer Bindungspartner für ParB ist ParA, eine andere P-loop-ATPase, die direkt an der Chromosomensegregation beteiligt ist<sup>[52,166,187]</sup>. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass ParB-Homologe die ATPase-Aktivität ihres dazugehörigen ParA-Proteins stimulieren<sup>[7,56,114,184]</sup>. Dies wurde jedoch nicht für die MipZ-ParB Interaktion beobachtet (**Abbildung 2.13 B**). Die Gegenwart von äquimolaren Mengen an ParB hatte nur einen etwa 1,7-fachen Anstieg der ATP-Hydrolyserate von MipZ zur Folge. Ein ähnlicher Anstieg war in Anwesenheit von  $5 \%$  PEG8000 im Messansatz zu beobachten (Daten nicht gezeigt), so dass davon auszugehen ist, dass die Zunahme der Hydrolyserate ein unspezifischer *crowding*-Effekt ist. Übereinstimmend damit führte auch eine weitere Erhöhung der ParB-Konzentration bis zu einem 4-fachen molaren Überschuss gegenüber MipZ zu keiner weiteren Erhöhung der ATPase-Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu resultierte die Zugabe von Plasmid-DNA, die eine Sequenz aus der Region des *Caulobacter*-Replikationsursprungs (*Con*) enthielt, in einer etwa verdoppelten katalytischen Aktivität, die durch die zusätzliche Anwesenheit von ParB wiederum nur um das ca. 1,2-fache weiter erhöht wurde (**Abbildung 2.13 B**).

Das Vorhandensein eines rekonstituierten *parS*/ParB-Nukleoproteinkomplexes hat somit keinen signifikanten Einfluss auf die katalytische Aktivität. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MipZ nur in seiner dimeren Form zur ATP-Hydrolyse befähigt ist und diese Aktivität, im Gegensatz zu ParA-Proteinen, nicht von ParB stimuliert wird. DNA dagegen ist in der Lage, die ATP-Hydrolyserate von MipZ moderat zu stimulieren.

MipZ reguliert die räumliche Positionierung des Divisoms, indem es die GTPase-Aktivität von FtsZ stimuliert<sup>[200]</sup>. Da FtsZ nur in der GTP-gebundenen Form Filamente ausbildet, die die Zellteilung unterstützen<sup>[78,147]</sup> und MipZ zudem einen bipolaren Gradienten ausbildet, erfolgt die Etablierung des Zellteilungskomplexes in der Zellmitte. Für die Stimulation der GTPase von FtsZ durch MipZ ist die Bindung von ATP, nicht aber dessen Hydrolyse erforderlich<sup>[200]</sup>. Im Zusammenhang mit den oben beschriebenen Ergebnissen deutet das darauf hin, dass nur das ATP-gebundene Dimer in der Lage ist, die GTPase-Aktivität von FtsZ zu stimulieren. Ist diese Annahme zutreffend, sollten die drei Substitutionsvarianten K13A, G14V und K18Q aufgrund der beeinträchtigten Dimerisierungsfähigkeit diese Aktivität nicht mehr aufweisen (siehe **Abbildung 2.5**). Tatsächlich waren diese MipZ-Varianten nicht mehr fähig, in einem *in vitro*-Aktivitätstest die intrinsische GTPase-Aktivität von FtsZ zu stimulieren (**Abbildung 2.14**). Unterstützt wird die daraus resultierende Schlussfolgerung, dass nur das MipZ-Dimer FtsZ binden und somit stimulieren kann, durch eine SPR-Analyse, die zeigte, dass nur WT-MipZ und die D42A-Variante in Gegenwart von ATP mit FtsZ interagierten (Daten nicht gezeigt).



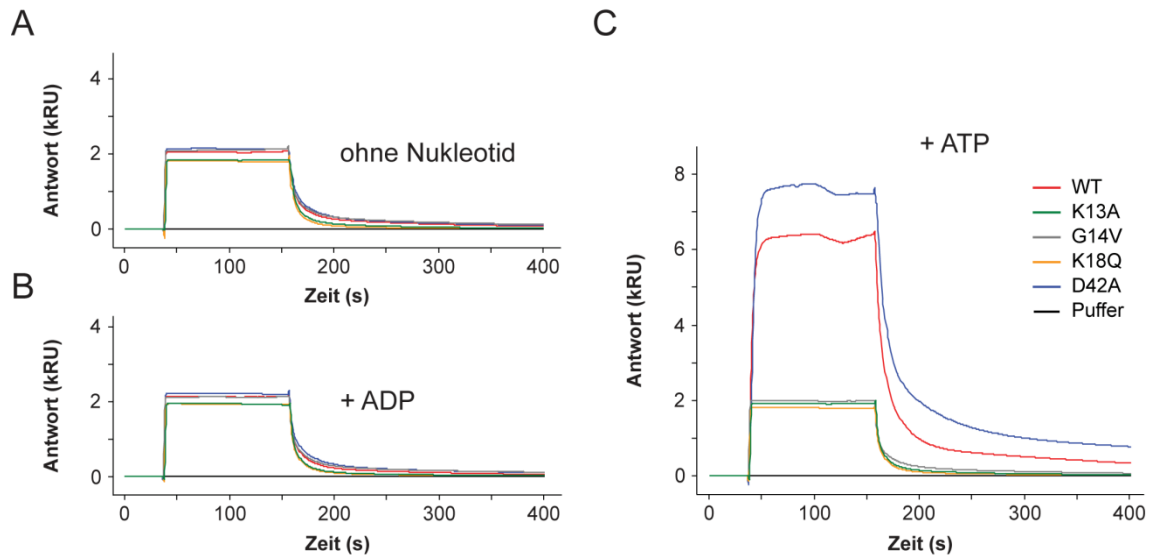
**Abbildung 2.14: Stimulation der GTPase-Aktivität von FtsZ durch MipZ-Proteine.** FtsZ (3  $\mu$ M) wurde mit 2 mM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP und 1 mM ATP ohne zusätzliches Protein (-) oder in Gegenwart des angezeigten MipZ-Proteins oder BSA (je 6  $\mu$ M) inkubiert. Gezeigt ist die hydrolytische Aktivität ( $k_{cat}$ ) von FtsZ unter den verschiedenen Bedingungen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Messungen ( $\pm$  SD).

## 2.4 MipZ Monomere und Dimere besitzen unterschiedliche Interaktionspartner und Mobilitäten

Bisher konnte gezeigt werden, dass der ATPase-Zyklus von MipZ eine monomere und eine dimere Form des Proteins umfasst, wobei die ATP-Bindung die Dimerisierung induziert (**Abbildung 2.12 A**). Durch diese Selbstinteraktion wird das katalytische Zentrum von MipZ vervollständigt und die ATP-Hydrolyse aktiviert. In der Folge zerfällt das Dimer, ADP wird gegen ATP ausgetauscht und der Zyklus beginnt von vorne. Um zu untersuchen, ob der Oligomerisierungszustand von MipZ die Interaktion nicht nur mit FtsZ, sondern auch mit seinen anderen Bindepartnern beeinflusst, wurde nachfolgend die Wechselwirkung mit ParB und DNA unter Zuhilfenahme der Substitutionsmutanten analysiert.

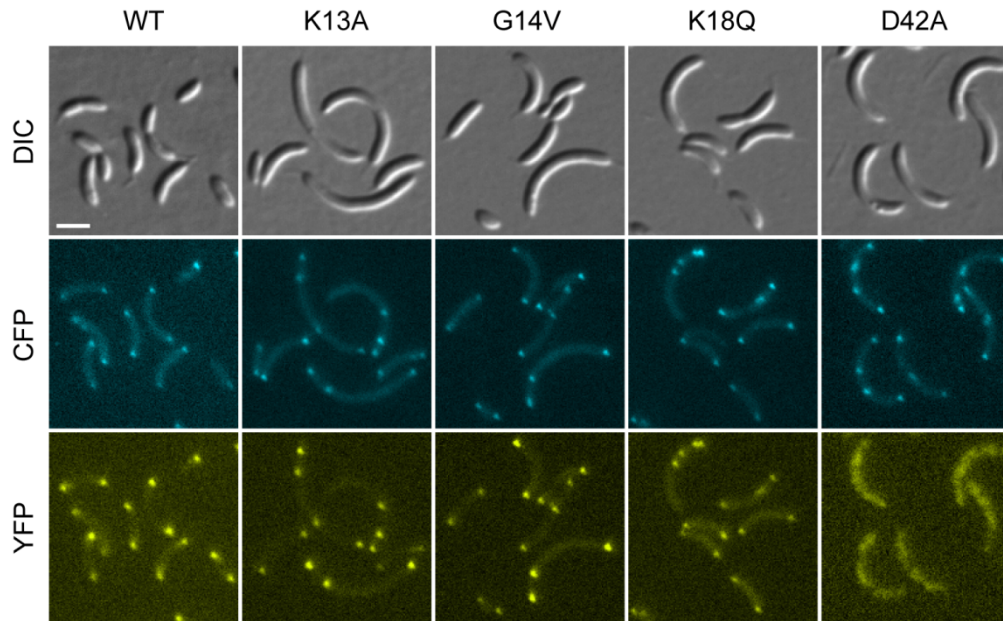
### 2.4.1 Die Interaktion von MipZ mit ParB ist konstitutiv

MipZ wird durch direkte Interaktion mit dem Chromosomensegregationsprotein ParB zu den Polen rekrutiert. Wird ParB aus den Zellen ausgedünnt, lokalisiert MipZ nicht mehr polar, sondern liegt vielmehr diffus in der Zelle verteilt vor<sup>[200]</sup>. *In vitro* wurde die direkte Assoziation von MipZ und ParB mittels SPR und eines elektrophoretischen Mobilitätsshift-Assays gezeigt<sup>[200]</sup>. Diese Studien wurden jedoch ohne Berücksichtigung des nukleotidgebundenen Status von MipZ durchgeführt. Um die Funktion von Nukleotidbindung und -hydrolyse für die Interaktion mit ParB näher zu untersuchen, wurden zunächst SPR-Analysen mit immobilisiertem ParB durchgeführt. MipZ wurde in Gegenwart verschiedener Nukleotide an die modifizierte Oberfläche transportiert. Dabei konnte eine Interaktion von MipZ mit ParB unabhängig vom gebundenen Nukleotid beobachtet werden (**Abbildung 2.15**). In Gegenwart von ATP wurde allerdings ein stärkeres Signal detektiert, welches nur teilweise auf die ATP-abhängige Dimerisierung zurückzuführen ist. Da sich die Antwort mit ATP jedoch mehr als verdoppelt (**Abbildung 2.15 C**), scheinen unspezifische Interaktionen aufgrund der fast sättigenden Proteinkonzentrationen aufzutreten. In Übereinstimmung mit dieser Annahme verdoppelt sich die Antwort für ATP-gebundenes MipZ im Vergleich zu nukleotidfreiem bzw. ADP-gebundenem MipZ bei nicht-sättigenden Proteinkonzentrationen (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie WT-MipZ zeigten auch alle seine Varianten eine Bindung an immobilisiertes ParB, unabhängig von ihrem nukleotidgebundenen Status. Allerdings ruft nur die D42A-Variante in Gegenwart von ATP eine erhöhte Antwort hervor, übereinstimmend damit, dass nur sie zur Dimerisierung befähigt ist. Ein ähnliches Ergebnis wurde in einem Experiment erhalten, in dem die MipZ-Proteine mit ATPγS inkubiert wurden. Jedoch steigerte sich die Antwort der WT- und D42A-Variante nicht in dem Maße wie im Ansatz mit ATP (Daten nicht gezeigt). Damit decken sich diese Daten mit den Beobachtungen während der Untersuchungen zur Homodimerisierung (siehe **Abbildung 2.5**) und lassen vermuten, dass ATPγS kein optimales Äquivalent zu ATP darstellt.



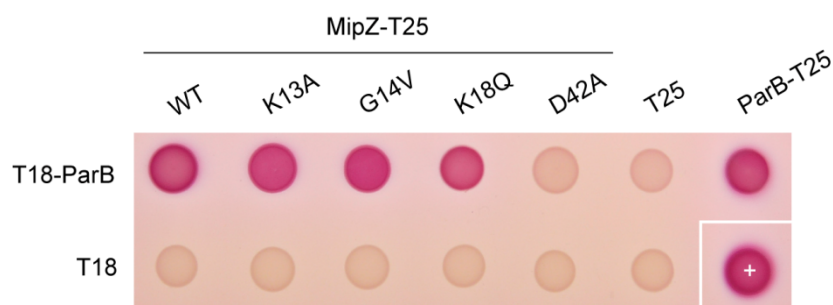
**Abbildung 2.15: Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse der MipZ-ParB-Interaktion.** ParB wurde auf einem CM5-Chip immobilisiert (3800 RU). Anschließend wurden die angegebenen MipZ-Proteine (6  $\mu$ M) **(A)** in Abwesenheit von Nukleotiden, **(B)** in Gegenwart von 1 mM ADP und **(C)** in Gegenwart von 1 mM ATP an die derivatisierte Oberfläche transportiert.

Die Interaktion der hydrolyse- und dimerisierungsbeeinträchtigten Varianten von MipZ (K13A, G14V und K18Q) mit ParB wurde mittels einer mikroskopischen Analyse von Stämmen, die sowohl MipZ-YFP (*yellow fluorescent protein*) als auch CFP-ParB (*cyan fluorescent protein*)-Fusionen synthetisieren, bestätigt (**Abbildung 2.16**). Alle drei Varianten zeigten, ähnlich wie WT-MipZ, polare Signale, die ausnahmslos mit ParB kolokalisierten. Das verdeutlicht, dass die Dimerisierung von MipZ keine Voraussetzung für die Lokalisation zum *parS*/ParB-Komplex darstellt. Wie bereits gezeigt<sup>[200]</sup>, weist das MipZ<sub>D42A</sub>-YFP-Fusionsprotein keine polare Lokalisation und somit auch keine klare Kolokalisation mit ParB auf, obwohl das Protein *in vitro* in der Lage ist, mit ParB in Wechselwirkung zu treten (siehe **Abbildung 2.15**). Das Lokalisationsmuster deutet darauf hin, dass die Interaktion der D42A-Variante mit ParB möglicherweise durch die Wechselwirkung mit einer anderen zellulären Komponente inhibiert wird.



**Abbildung 2.16: Kolokalisation der MipZ-Varianten mit ParB.** Die Stämme DK4 (WT), DK3 (K13A), DK5 (G14V), DK6 (K18Q) und DK7 (D42A), die WT-*mipZ* unter Kontrolle des durch Ammonium-reprimierbarem  $P_{nrx}$ -Promotors, das *mipZ-yfp* Konstrukt von dem Xylose-induzierbarem  $P_{xyf}$ -Promotor und *cfp-parB* unter Kontrolle des Inositol-induzierbarem  $P_{iof}$ -Promotors<sup>[14]</sup> exprimieren, wurden von M2G<sub>N</sub> in M2G Medium überführt. Nach sechsstündiger Inkubation mit 0,3 % Xylose erfolgte die Zugabe von 0,3 % Inositol. Nach weiteren 2 h Inkubation wurden die Stämme mikroskopiert. Größenstandard: 2 µm

Die direkte Interaktion der P-loop-Varianten mit ParB konnte darüber hinaus ebenfalls mit Hilfe des bakteriellen Zwei-Hybrid-Systems bestätigt werden (Abbildung 2.17). Im Gegensatz dazu war auch hier keine Wechselwirkung zwischen der D42A-Variante und ParB detektierbar, was erneut darauf hinweist, dass eine andere Interaktion mit der Bindung des D42A-Proteins an ParB konkurriert. Die bereits gezeigte Selbstinteraktion von ParB konnte mit Hilfe dieses Experiments ebenfalls bestätigt werden<sup>[115,174]</sup>.

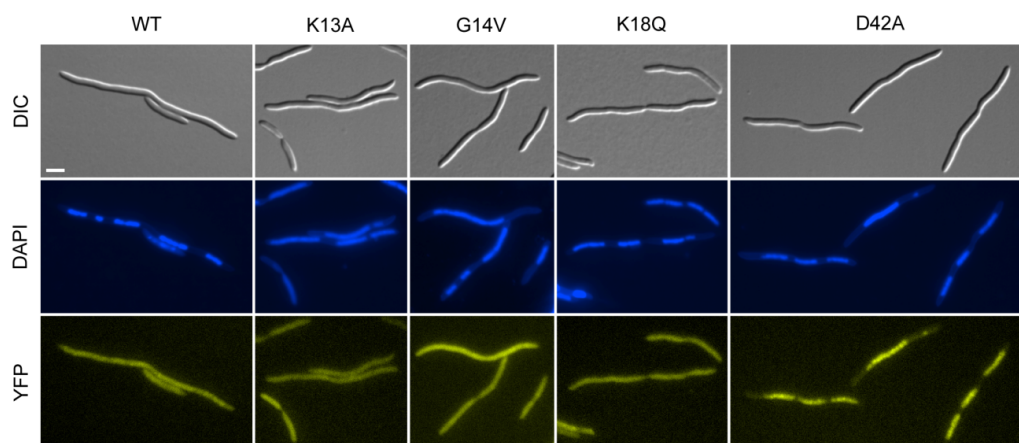


**Abbildung 2.17: Bakterien-Zwei-Hybrid-Analyse der Interaktion der MipZ-Varianten mit ParB.** Der Reporterstamm *E. coli* BTH101 wurde mit zwei Plasmiden kotransformiert, die Gene für Fusionen von MipZ an das T25-Fragment und von ParB an das T18-Fragment der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* kodieren. Transformanten wurden auf McConkey-Indikatorplatten ausgestrichen. Eine Interaktion zwischen MipZ-Proteinen und ParB rekonstituierte die Adenylatcyclase, sichtbar an einer Rotfärbung der Kolonien. Als Positivkontrolle für den Assay (+) wurden Fusionen an die Leucinzipperregion des GCN4-Proteins aus *S. cerevisiae* verwendet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Interaktion zwischen MipZ und ParB bezüglich des nukleotidgebundenen Status von MipZ konstitutiv ist. MipZ ist in der Lage, sowohl in der monomeren als auch in der ATP-gebundenen, dimeren Form mit ParB in Wechselwirkung zu treten, so dass die polare Lokalisation von MipZ keine Dimerisierung voraussetzt. Darüber hinaus scheint ParB die ATPase-Aktivität von MipZ nicht aktiv zu beeinflussen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ParB an einer anderen Stelle in den ATPase-Zyklus von MipZ eingreift.

## 2.4.2 Das MipZ-Dimer bindet unspezifisch und nicht-kooperativ an DNA

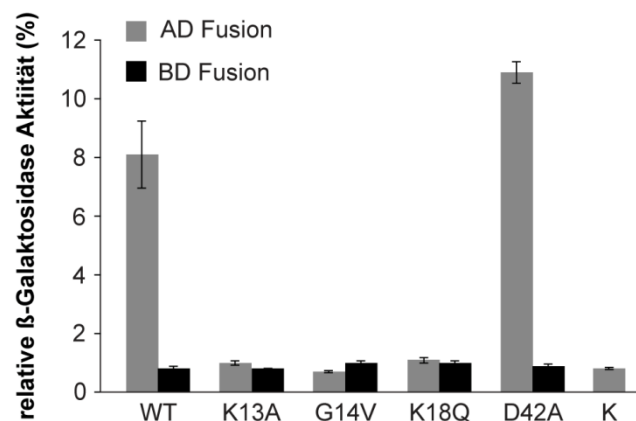
Lokalisationsstudien zeigten, dass die D42A-Variante ungleichmäßig im Zytoplasma verteilt vorliegt<sup>[200]</sup> (**Abbildung 2.16**). Dieses Muster lässt darauf schließen, dass das Protein in der Zelle nicht frei diffusionsfähig ist. Da in *C. crescentus* das Nukleoid die gesamte Zelle ausfüllt, könnte diese unregelmäßige Verteilung aus einer Interaktion des MipZ-Proteins mit DNA resultieren. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass andere P-loop-ATPasen DNA-bindende Eigenschaften aufweisen<sup>[22,79,114,165]</sup>. Um die Fähigkeit von MipZ, mit dem Nukleoid zu assoziieren, näher zu analysieren, wurden YFP-Fusionen von WT-MipZ und seinen Varianten heterolog in *E. coli* produziert. *E. coli* besitzt weder MipZ noch ein ParAB-basiertes Chromosomensegregationssystem und ist somit gut für eine direkte Analyse der MipZ-Nukleoid-Interaktion geeignet. Die mikroskopische Auswertung zeigte, dass WT-MipZ sowie die K13A-, G14V- und K18Q-Varianten gleichmäßig in der Zelle verteilt vorlagen (**Abbildung 2.18**). Die D42A-Variante dagegen zeigte eine konstante Kolokalisation mit den kondensierten Nukleoiden, was darauf hinweist, dass MipZ fähig ist, mit DNA zu interagieren, wenn es in der ATP-gebundenen, dimeren Form vorliegt. Die diffuse Verteilung von WT-MipZ könnte in diesem Zusammenhang mit dessen ATPase-Aktivität erklärt werden. Sie führt dazu, dass MipZ sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegt, so dass vorhandenes, monomeres MipZ das Signal der DNA-gebundenen Dimere maskiert.



**Abbildung 2.18: Interaktion von MipZ mit dem *E. coli*-Nukleoid.** Der *E. coli* Stamm TOP10 wurde mit den Plasmiden pDK2 ( $P_{BAD}$ -mipZ-yfp), pDK7 ( $P_{BAD}$ -mipZ<sub>K13A</sub>-yfp), pDK8 ( $P_{BAD}$ -mipZ<sub>G14V</sub>-yfp), pDK9 ( $P_{BAD}$ -mipZ<sub>K18Q</sub>-yfp) oder pDK3 ( $P_{BAD}$ -mipZ<sub>D42A</sub>-yfp) transformiert und für 2 h in Anwesenheit von Cephalaxin (5 µg/ml) und Arabinose (0,1 %) gezogen. Dies inhibierte die Zellteilung und induzierte die Synthese der Fusionsproteine. 30 min vor der Analyse wurde den Kulturen Chloramphenicol (100 µg/ml) zur Kondensation der Nukleole zugesetzt. Nach Färbung der DNA mit DAPI wurden die Zellen mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Größenstandard: 3 µm



Einen weiteren Hinweis für die DNA-bindende Aktivität von MipZ lieferte eine Hefe-Ein-Hybrid-Analyse (**Abbildung 2.19**). Fusionen von WT-MipZ oder der D42A-Variante an die Transaktivierungsdomäne des GAL4-Proteins aus *S. cerevisiae* induzierten die Transkription des  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergens *lacZ*, welches unter Kontrolle eines GAL4-abhängigen Promotors steht. Im Gegensatz dazu hatten Fusionen mit den MipZ-Varianten K13A, G14V und K18Q keinen Effekt auf die Transkription des *lacZ*-Gens. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass die Dimerisierung die unspezifische Interaktion von MipZ mit DNA induziert. Dadurch gelangte die Transaktivierungsdomäne des GAL4-Proteins, die an sich keine DNA-bindenden Eigenschaften besitzt, zum Promotor und induzierte die Expression des *lacZ*-Reportergens.

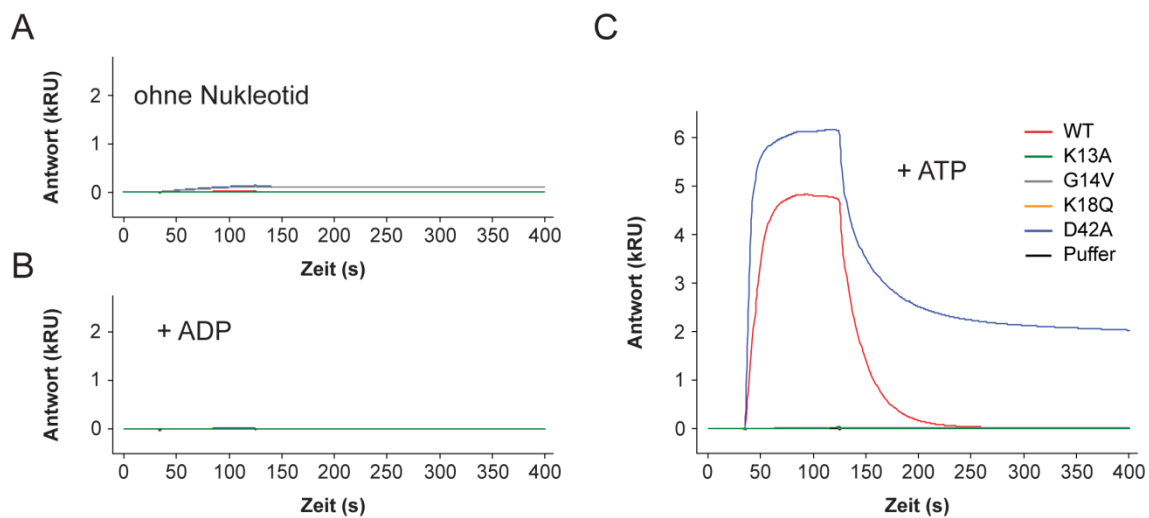


**Abbildung 2.19: Detektion der DNA-Bindeaktivität von MipZ durch eine Hefe-Ein-Hybrid-Analyse.** Hefestämme, die Fusionen von MipZ und seinen Varianten an die Transaktivierungsdomäne (AD) bzw. die Bindedomäne (BD) des GAL4-Transkriptionsregulators produzieren, wurden auf die Expression des *lacZ*-Gens getestet. Die Aktivitäten wurden auf einen Stamm, der das komplette GAL4-Protein synthetisiert, normalisiert. Als Negativkontrolle (K) diente ein Stamm, der allein die physikalisch getrennten GAL4-Transaktivierungs- und Bindedomänen produzierte. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Messungen ( $\pm$  SD).

Um eventuelle Artefakte, die mit den *in vivo*-Analysen verbunden sein könnten, auszuschließen, wurden die DNA-bindenden Eigenschaften von MipZ anschließend in verschiedenen *in vitro*-Systemen untersucht.

Zunächst wurde die Nukleotidabhängigkeit der MipZ-DNA-Interaktion mittels SPR untersucht. Kurze, doppelsträngige Oligonukleotide wurden zu diesem Zweck auf einem SA-Sensorchip immobilisiert. Die DNA-Moleküle enthielten entweder ein einzelnes *parS*-Motiv (*parS*<sub>WT</sub>), eine mutierte Variante von *parS* (*parS*<sub>mt</sub>) oder komplett zufällige Sequenzen (*ran1* und *ran2*). Keines der MipZ-Proteine interagiert mit diesen DNA-Fragmenten in Abwesenheit von Nukleotiden oder in Gegenwart von ADP (**Abbildung 2.20 A und B**). Wurden die Proteine dagegen mit ATP vorinkubiert, dann zeigten sowohl WT-MipZ als auch die D42A-Variante ein starkes Signal, das die Bindung an die DNA reflektiert (**Abbildung 2.20 C**). Das Auftreten dieses Signals war unabhängig von dem auf dem Chip immobilisierten Oligonukleotid (Daten nicht gezeigt). Im Unterschied dazu waren die K13A-, G14V- und K18Q-Varianten auch mit ATP nicht in der Lage, eine Antwort zu induzieren (**Abbildung 2.20**). Diese Ergebnisse bestätigen, dass DNA-Bindung die ATP-abhängige Dimerisierung voraussetzt und sequenzunspezifisch erfolgt. Interessanterweise dissoziierte MipZ in zwei Phasen von den immobilisierten DNA Fragmenten, wobei es sich bei der ersten, schnellen Phase vermutlich um sekundäre Bindestellen handelt.

Für die D42A-Variante war die zweite, langsamere Phase bedeutend länger, wodurch auch ca. vier Minuten nach Ende der Injektion noch Protein an der Chipoberfläche gebunden war (**Abbildung 2.20 C**). Diese Beobachtung könnte mit der reduzierten ATPase-Aktivität und dem darauf zurückzuführenden, stabileren Dimer dieses Proteins erklärt werden. Dies wiederum würde bedeuten, dass auch die Dissoziation von der DNA mit der ATP-Hydrolyse und somit dem Zerfall des Dimers gekoppelt ist. Allerdings lässt sich diese Annahme nicht mit einem Experiment in Gegenwart von ATP $\gamma$ S bestätigen, da, wie zuvor bereits angemerkt, dieses Analogon nicht äquivalent zu ATP zu sein scheint. Ähnlich zu den Dimerisierungsexperimenten fiel auch hier die Antwort mit ATP $\gamma$ S deutlich kleiner aus als mit ATP (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen einer anderen Studie, in der ATP, nicht aber ATP $\gamma$ S die Bindung von P1-ParA an DNA induzierte<sup>[206]</sup>.

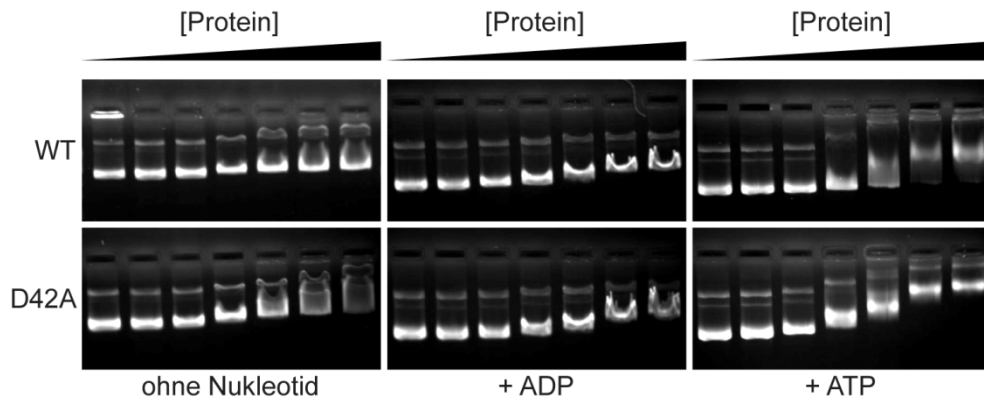


**Abbildung 2.20: Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse der MipZ-DNA-Interaktion.** Ein 26 bp langes, doppelsträngiges Oligonukleotid (ran2) wurde auf einem SA-Chip immobilisiert (500 RU). Anschließend wurden die angegebenen MipZ-Proteine (6  $\mu$ M) (**A**) in Abwesenheit von Nukleotiden, (**B**) in Gegenwart von 1 mM ADP und (**C**) in Gegenwart von 1 mM ATP über die modifizierte Oberfläche geschickt. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Oligonukleotide *par*<sub>WT</sub>, *par*<sub>mt</sub> und *ran1* erhalten (Daten nicht gezeigt).

In einem zweiten Ansatz konnte die ATP-Abhängigkeit der DNA-Bindung mittels eines elektrophoretischen Mobilitätsshift-Assays (EMSA) bestätigt werden (**Abbildung 2.21**). Nur in Gegenwart von ATP zeigten WT-MipZ und die D42A-Variante eine eindeutige Interaktion mit dem Plasmid, welches sich in einer langsameren Migration der DNA während der Elektrophorese widerspiegelte. Die Bindung von MipZ resultierte dabei in einer diffusen Migration der DNA, bedingt durch die ATP-Hydrolyse und damit verbundene Dissoziation des Dimers. Die Assoziation der hydrolysebeeinträchtigten D42A-Variante führte im Gegensatz dazu zur Ausbildung eines distinkten Nukleoproteinkomplexes. Bei höheren Proteinkonzentrationen war auch ohne Nukleotid oder in Gegenwart von ADP eine Verschiebung der Laufhöhe der DNA zu beobachten, welche wahrscheinlich auf die Bildung eines unspezifischen Komplexes, bedingt durch den Überschuss an Protein gegenüber DNA, zurückzuführen ist. Die linear von der Konzentration des Proteins abhängige, reduzierte Laufgeschwindigkeit der DNA lässt ferner vermuten, dass MipZ nicht-kooperativ mit DNA interagiert. Unterstützt wird diese Vermutung durch eine *rotary shadowing*-Elektronenmikroskopie der D42A-Variante im Komplex mit DNA. Unabhängig von der

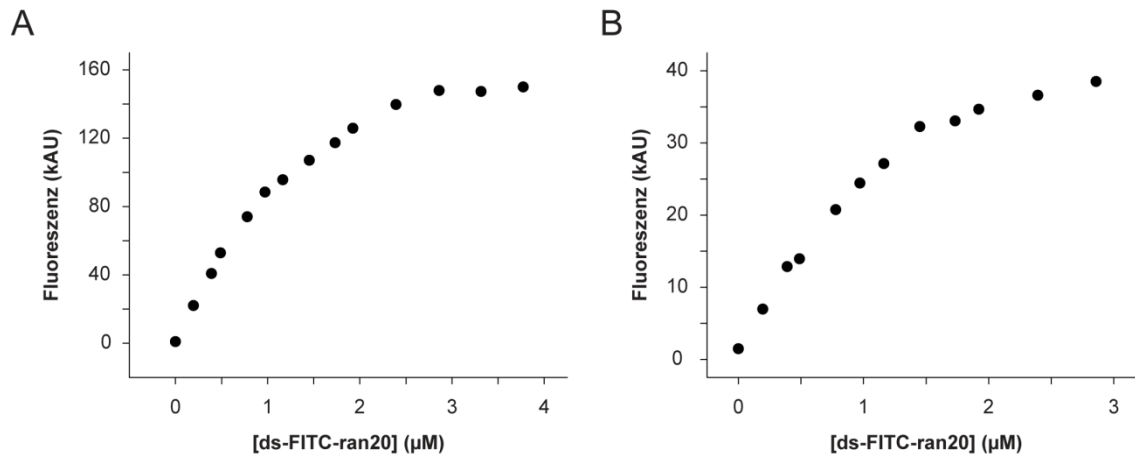


eingesetzten Proteinkonzentration waren die dimeren Proteinkomplexe, die mit der DNA assoziierten, immer eindeutig voneinander getrennt, jedoch scheinbar in zufälligen Intervallen verteilt (K. Michie, persönliche Korrespondenz). Es ist jedoch anzumerken, dass diese Experimente in Gegenwart von ATP $\gamma$ S durchgeführt wurden, welches, wie bereits mehrmals angemerkt, kein vollständiges Äquivalent zu ATP darstellt.



**Abbildung 2.21: Detektion der MipZ-DNA-Interaktion mittels EMSA.** Plasmid-DNA (20 nM; 2,79 kb) wurde ohne Protein (Spur 1) oder mit steigenden Konzentrationen an WT-MipZ oder der D42A-Variante (1-10  $\mu$ M) inkubiert. Wo gekennzeichnet, wurden die entsprechenden Nukleotide in einer Endkonzentration von 0,75 mM zugesetzt. Die Komplexe wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid visualisiert.

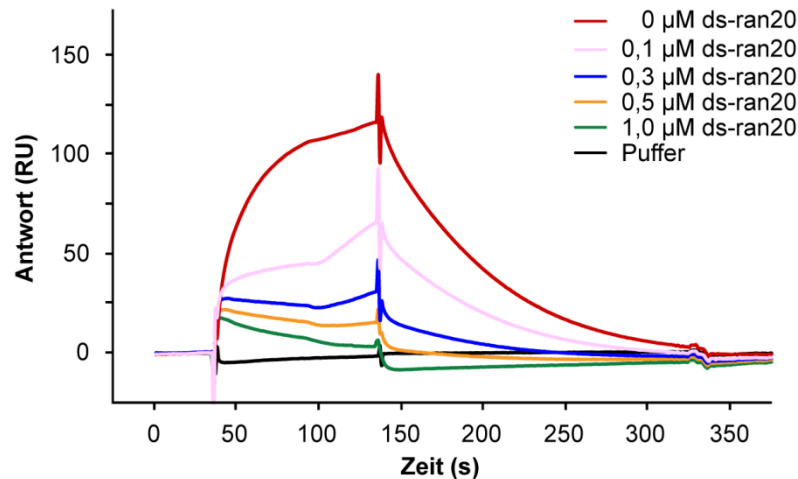
In einem letzten Experiment wurde die MipZ-DNA-Interaktion mittels spektroskopischer Analyse der Bindung von MipZ an fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide getestet (**Abbildung 2.22**). Da durch Variation der MipZ-Konzentration die Konzentration des zur DNA-Bindung befähigten MipZ-Dimers verändert wird, wurde stattdessen eine konstante MipZ-Konzentration (10  $\mu$ M) mit steigenden Konzentrationen eines doppelsträngigen Oligonukleotids titriert und die Zunahme der Fluoreszenz bei Bindung des Proteins an die DNA im Vergleich zu einer Kontrolltitration ohne Protein gemessen. Wie erwartet führte die Bindung des Proteins an das Oligonukleotid zu einer Änderung der direkten Umgebung des Fluorophors, die wiederum in einer Zunahme der Fluoreszenz resultierte. Mit steigenden DNA-Konzentrationen nahm die Fluoreszenz aufgrund der fortschreitenden Bildung von Nukleoproteinkomplexen zu, um schließlich bei einer Konzentration von etwa 2  $\mu$ M DNA in eine Sättigung überzugehen (**Abbildung 2.22**). Da die Oligonukleotidkonzentration, bei der eine Sättigung des Fluoreszenzsignals auftrat, proportional zur Proteinkonzentration war (Daten nicht gezeigt), handelte es sich hier um eine stöchiometrische Titration, d.h. die verwendete MipZ-Dimerkonzentration war größer als die Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die MipZ-DNA-Interaktion. Dadurch lag zu keinem Zeitpunkt freies Oligonukleotid in der Lösung vor und das System befand sich damit nicht im dynamischen Gleichgewicht, so dass eine Bestimmung des  $K_D$  nicht möglich war. Die einzige Aussage, die getroffen werden kann, ist, dass der  $K_D$  für die MipZ-DNA-Interaktion kleiner als 2  $\mu$ M ist. Eine genauere Bestimmung erfordert die Verringerung der MipZ-Konzentration unter den  $K_D$ . Allerdings reduziert sich dadurch auch die Konzentration an dimerem MipZ, so dass das Signal-Rausch-Verhältnis abnimmt.



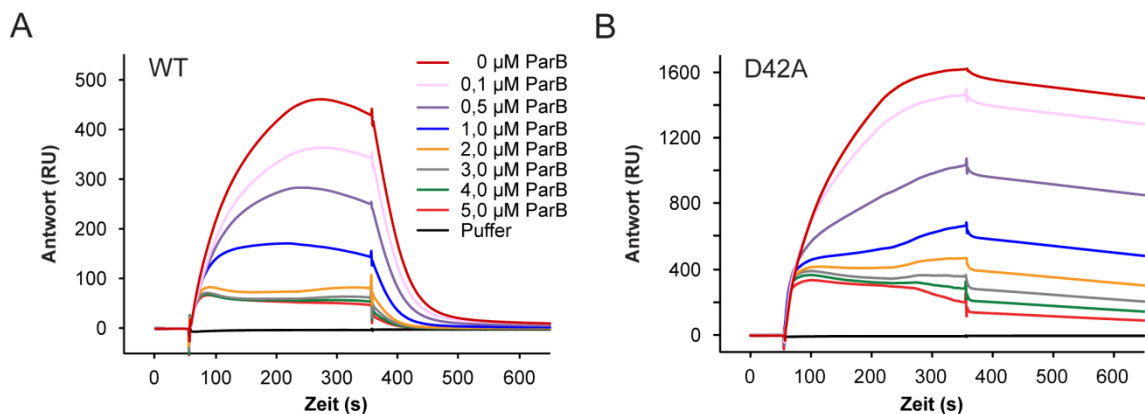
**Abbildung 2.22: Gleichgewichtsmessung der Interaktion von WT-MipZ und der D42A-Variante mit DNA.** (A) MipZ bzw. (B) seine D42A-Variante (je 10 µM) wurden in Gegenwart von 2 mM ATP mit steigenden Konzentrationen eines fluoreszenzmarkierten 20 bp-Oligonukleotids titriert und die Änderung der FITC-Fluoreszenz verfolgt. Alle Messpunkte stellen mit Hilfe einer Kontrolltitration ohne Protein korrigierte Werte dar.

### 2.4.3 Die Bindung des MipZ Dimers an die DNA konkurriert mit der Bindung an ParB

Es wurde gezeigt, dass ATP-abhängige Dimerisierung die DNA-Bindung von MipZ induziert. Im Gegensatz dazu ist die Interaktion von MipZ mit ParB unabhängig vom Nukleotidstatus von MipZ und somit auch von dessen Oligomerisierungszustand. Das Dimer ist also in der Lage, sowohl mit ParB als auch DNA in Wechselwirkung zu treten. Um zu klären, ob DNA und ParB um die Bindung an MipZ konkurrieren, wurden Konkurrenzexperimente mittels SPR durchgeführt. Zunächst wurde der Einfluss steigender Konzentrationen an unspezifischem Oligonukleotid auf die MipZ-ParB-Interaktion analysiert (**Abbildung 2.23**). Wie zuvor bereits gezeigt, band MipZ in Gegenwart von ATP an immobilisiertes ParB. Die gleichzeitige Zugabe von steigenden Konzentrationen eines unspezifischen, doppelsträngigen Oligonukleotids kompetierte effizient mit der ParB-Interaktion, sichtbar an einer Abnahme des Signals. Umgekehrt konkurrierte auch ParB mit einem immobilisierten DNA-Fragment um die Bindung an MipZ (**Abbildung 2.24 A**). Das lässt vermuten, dass die beiden Interaktionspartner mit überlappenden Regionen von MipZ in Wechselwirkung treten und sich somit gegenseitig ausschließen. Ein ähnliches Ergebnis wurde in einem Experiment mit der D42A-Variante erhalten. Auch hier war ParB in der Lage, mit dem Protein zu interagieren und dadurch die Bindung der D42A-Variante an DNA zu reduzieren (**Abbildung 2.24 B**). Zu beachten ist, dass auch hier, wie schon im Experiment zur DNA-Bindung, die D42A-Variante bei gleichen Konzentrationen ein höheres Signal ergab als WT-MipZ. Zudem fiel die Antwort mit dem WT-Protein schnell wieder ab, wohingegen sie bei der D42A-Variante nur sehr langsam abnahm. Diese beiden Beobachtungen unterstützen die bereits zuvor gemachte Annahme, dass das D42A-Protein einerseits mit einer höheren Affinität dimerisiert und andererseits die Dissoziation von der DNA mit dem Dimerzerfall verbunden ist.



**Abbildung 2.23: Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse der Bindung von MipZ an ParB in Konkurrenz mit DNA.** ParB wurde auf einem CM5-Chip immobilisiert (200 RU) und anschließend MipZ (0,5 µM) und ATP (2 mM) in Gegenwart steigender Konzentrationen eines unspezifischen, 20 bp langen, doppelsträngigen Oligonukleotids (ran20) über die modifizierte Oberfläche geschickt. Das DNA-Fragment allein zeigte keine Bindung an ParB (Daten nicht gezeigt).

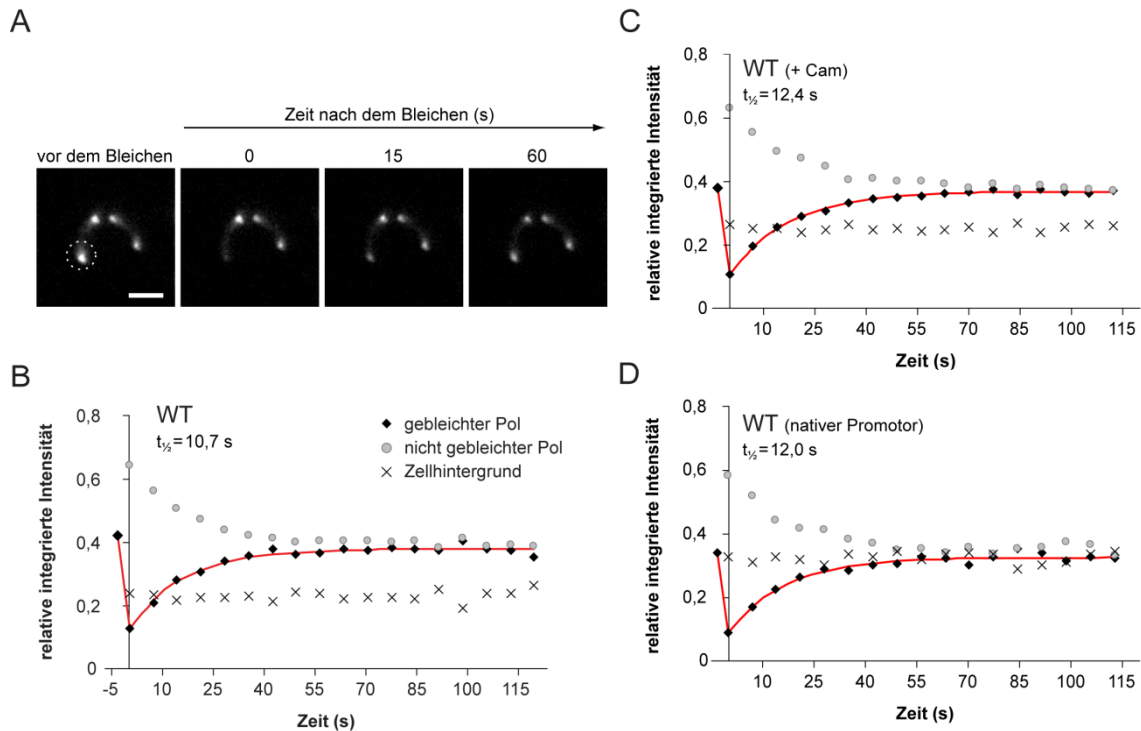


**Abbildung 2.24: Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse der Bindung von MipZ an DNA in Konkurrenz mit ParB.** Ein 26 bp langes, doppelsträngiges Oligonukleotid (ran2) wurde auf einem SA-Chip immobilisiert (500 RU). Anschließend wurde (A) MipZ bzw. (B) dessen D42A-Variante (je 0,5 µM) in Gegenwart von ATP (2 mM) und steigenden Konzentrationen ParB über die modifizierte Oberfläche geschickt. ParB allein zeigte keine Bindung an das immobilisierte DNA-Fragment (Daten nicht gezeigt).

#### 2.4.4 Die Bindung an das Nukleoid bestimmt die Mobilität von MipZ

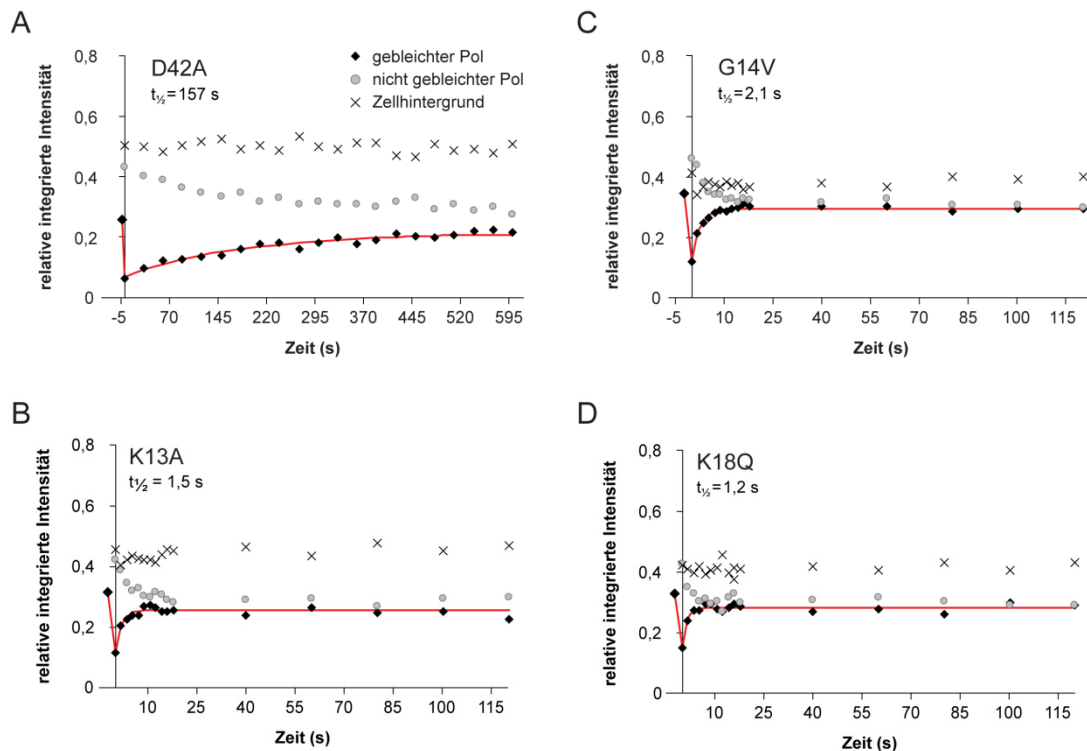
Aufgrund ihrer Fähigkeit, unspezifisch mit DNA zu interagieren, sollten MipZ-Dimere zum größten Teil mit dem Nukleoid assoziiert sein und demzufolge langsamere Diffusionsraten als monomeres MipZ aufweisen. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Mobilität von WT-MipZ und seinen Derivaten in FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)-Experimenten analysiert (Abbildung 2.25). Hierbei wird ein Fluoreszenzsignal durch die Anwendung eines kurzen fokussierten Laserpulses in einer definierten Region der Zelle irreversibel ausgelöscht und das Wiederauftreten der Fluoreszenz in dieser Region über einen bestimmten Zeitraum verfolgt.

Eine wiedererscheinende Fluoreszenz resultiert dabei aus der Diffusion nicht gebleichter Moleküle in die gebleichte Region. Um die Mobilität der MipZ-Proteine auf diese Weise *in vivo* untersuchen zu können, wurden anstelle des WT-Proteins induzierbare Fusionen an YFP in *C. crescentus* produziert. Zur Analyse wurden Zellen verwendet, die zwei polare Fluoreszenzsignale aufwiesen und kurz vor der Teilung standen. In diesen Zellen wurde die Fluoreszenz eines polaren MipZ Komplexes durch einen kurzen Laserpuls gebleicht und die Änderung des Signals dieser gebleichten Region sowie des nicht gebleichten Pols als auch der gesamten Zelle über einige Minuten verfolgt. In Zellen, die eine induzierbare Fusion von YFP an WT-MipZ synthetisierten, war das Fluoreszenzsignal des gebleichten Pols innerhalb einer Minute wiederhergestellt (**Abbildung 2.25 A**). Quantitative, zeitaufgelöste Messungen ergaben eine Halbwertszeit für die Rückkehr des Fluoreszenzsignals ( $t_{1/2}$ ) von  $10,7 \pm 0,9$  s ( $n=24$  Zellen) (**Abbildung 2.25 B**). Zur gleichen Zeit nahm die Fluoreszenz des nicht gebleichten Pols, proportional zum Wiederauftreten des Signals am gebleichten Pol, ab, während die gesamte integrierte Fluoreszenz der Zelle konstant blieb. Nahezu identische Ergebnisse wurden in Gegenwart des Translationsinhibitors Chloramphenicol sowie mit einem Stamm erhalten, der die MipZ-YFP Fusion vom nativen *mipZ*-Lokus aus produziert (**Abbildung 2.25 C und D**). Man kann somit davon ausgehen, dass die beobachtete Dynamik weder auf einer Proteolyse und anschließenden Neusynthese des Fusionsproteins beruht, noch durch die induzierte Synthese des Fusionsproteins beeinflusst ist. Sie ist vielmehr das Resultat eines kontinuierlichen Austauschs von MipZ-Molekülen zwischen den Zellpolen.



**Abbildung 2.25: FRAP-Analyse der MipZ-Diffusion.** (A) Repräsentative Bilder eines FRAP-Experiments mit einer Zelle, die MipZ-YFP synthetisiert. Zellen des Stammes MT177 ( $\Delta mipZ P_{ntx}::mipZ P_{xyf}::mipZ-yfp$ ) wurden von M2G<sub>N</sub>- in M2G-Medium mit 0,3 % Xylose überführt und für 4 h kultiviert, um WT-MipZ aus den Zellen auszudünnen und stattdessen die YFP-Fusion zu produzieren. Eines der polaren MipZ-Signale (markiert durch einen Kreis) wurde mittels eines Laserpulses gebleicht und die Rückkehr der Fluoreszenz über Mikroskopie verfolgt (Größenstandard: 2  $\mu$ m). (B,C) Quantifizierung des Wiederauftretens der Fluoreszenz in Zellen, die MipZ-YFP unter Kontrolle des Xylose-induzierbaren  $P_{xyf}$ -Promotors (MT177) synthetisieren. Zellen wurden gezogen wie unter (A) beschrieben. In dem unter (C) beschriebenen Experiment wurde der Kultur 25 min vor der mikroskopischen Analyse sowie dem Agarosepad Chloramphenicol (20  $\mu$ g/ml) zugesetzt. Nach Bleichen des Fluoreszenzsignals eines Zellpols wurden Bilder zu den angegebenen Zeitpunkten aufgenommen. Die Graphen zeigen die durchschnittliche relative integrierte Intensität des gebleichten Pols, des nicht gebleichten Pols und des Rests der Zelle als Funktion der Zeit. Eine Beschreibung der Daten für den gebleichten Pol durch eine einfach-exponentielle Funktion (rote Kurve) ergab eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von (B)  $10,7 \pm 0,9$  s und (C)  $12,4 \pm 0,5$  s. (D) Zellen des Stammes MT97 ( $mipZ-eyfp$ ) wurden in M2G-Medium gezogen und der FRAP-Analyse unterzogen. Die eingepasste Kurve entspricht einer Halbwertszeit von  $12,0 \pm 1,2$  s.

Die Analyse von Zellen, die eine der vier mutierten Varianten von MipZ produzierten, zeigte, dass keines dieser Proteine eine zu WT-MipZ vergleichbare Mobilität besitzt (Abbildung 2.26). Zellen, die ein YFP-Fusionsprotein mit der D42A-Substitution synthetisierten, wiesen mit einer Halbwertszeit von  $157 \pm 28$  s ( $n=19$  Zellen) eine sehr langsame Kinetik für das Wiederauftreten des Fluoreszenzsignals auf (Abbildung 2.26 A). Eine Verschiebung des Gleichgewichts hin zur dimeren Form reduziert somit eindeutig die Mobilität von MipZ in der Zelle. Im Gegensatz dazu zeigten die dimerisationsdefizienten Varianten von MipZ (K13A, G14V, K18Q) beschleunigte Dynamiken (Abbildung 2.26 B-D). Die Halbwertszeit für das Wiedererscheinen des Fluoreszenzsignals nach dem Bleichen fiel auf  $1,5 \pm 0,3$  s ( $n=23$  Zellen) für die K13A-Variante, auf  $2,1 \pm 0,2$  s ( $n=29$  Zellen) für das G14V-Protein und auf  $1,2 \pm 0,2$  s ( $n=17$  Zellen) für die K18Q-Variante. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die ATP-abhängige Dimerisation die Diffusion von MipZ verlangsamt, indem es eine Interaktion mit chromosomaler DNA induziert.



**Abbildung 2.26: FRAP-Analyse von Zellen, die YFP-Fusionen der MipZ-Varianten produzieren.** Zellen der Stämme (A) MT197 ( $\Delta mipZ$   $P_{nrx}::mipZ$   $P_{xyl}::mipZ_{D42A}-yfp$ ), (B) DK2 ( $\Delta mipZ$   $P_{nrx}::mipZ$   $P_{xyl}::mipZ_{K13A}-yfp$ ), (C) MT178 ( $\Delta mipZ$   $P_{nrx}::mipZ$   $P_{xyl}::mipZ_{G14V}-yfp$ ) und (D) MT179 ( $\Delta mipZ$   $P_{nrx}::mipZ$   $P_{xyl}::mipZ_{K18Q}-yfp$ ) wurden von M2G<sub>N</sub><sup>-</sup> in M2G-Medium mit 0,3 % Xylose überführt und für 4 h kultiviert, um WT-MipZ aus den Zellen auszudünnen und stattdessen die Produktion der YFP-Fusion zu induzieren. Details zum experimentellen Ablauf und der Datenanalyse sind in der Legende zu Abbildung 2.25 dargestellt. Eine Beschreibung der Daten für den gebleichten Pol durch eine einfach-exponentielle Funktion (rote Kurve) ergab eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $157 \pm 28$  s (D42A),  $1,5 \pm 0,3$  s (K13A),  $2,1 \pm 0,2$  s (G14V) und  $1,2 \pm 0,2$  s (K18Q).

## 2.5 Der ATPase-Zyklus ist essentiell für die Gradientenbildung und Funktionalität von MipZ

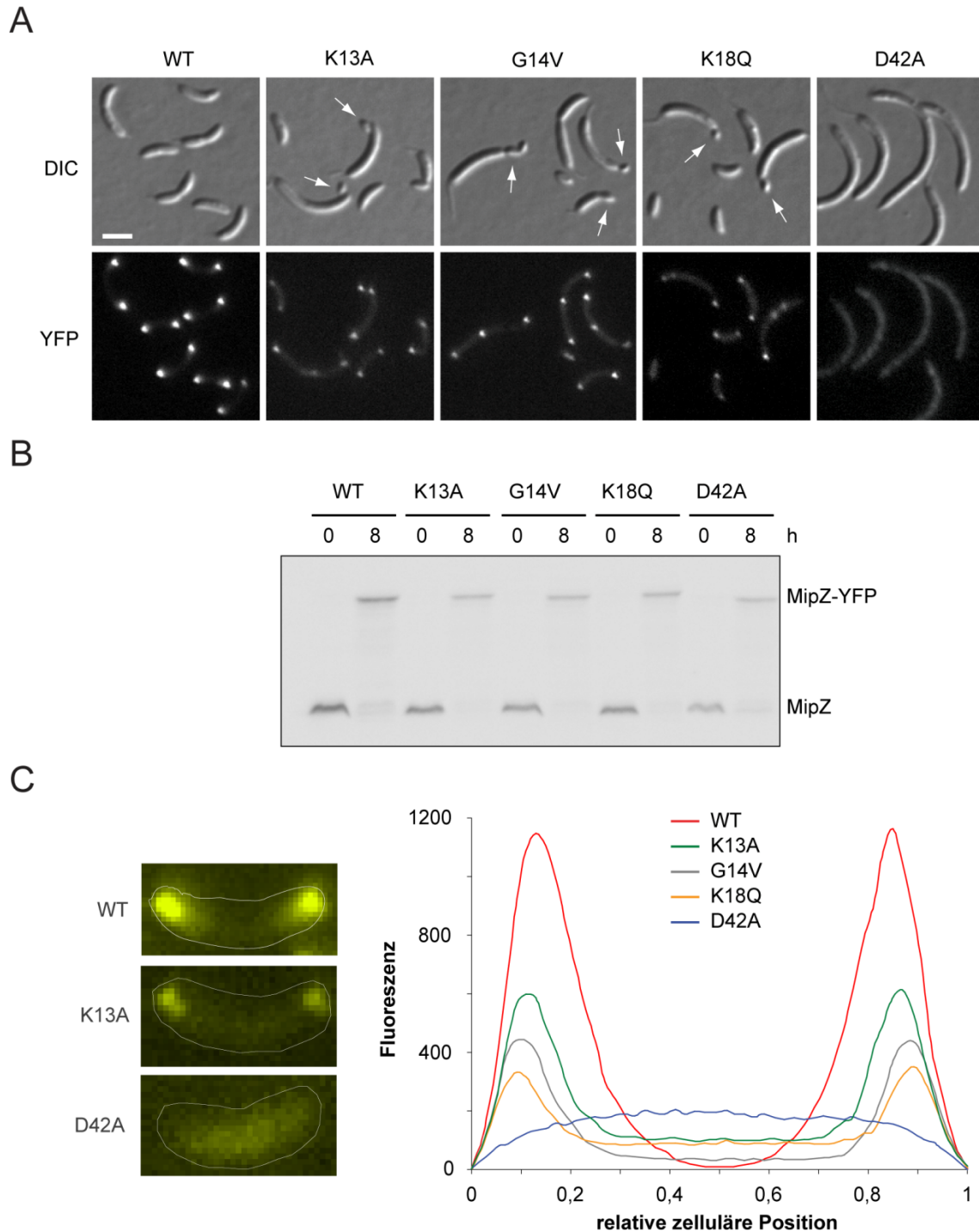
Bisher konnte gezeigt werden, dass der ATPase-Zyklus von MipZ eine regulatorische Funktion erfüllt, wobei das Dimer die biologisch aktive Form darstellt, die mit FtsZ interagiert. Die ATP-Bindung durch zwei Monomere induziert die Dimerisierung und vervollständigt gleichzeitig die katalytische Domäne. ADP, das bei der ATP-Hydrolyse gebildet wird, ist nicht in der Lage, das Dimer zu stabilisieren, so dass der Komplex als Folge der Katalyse zerfällt. Nach erfolgreichem Nukleotidaustausch beginnt dieser Zyklus von neuem (siehe **Abbildung 2.12 A**).

Keine der untersuchten MipZ-Varianten ist in der Lage, den ATPase-Zyklus des WT-Proteins zu durchlaufen. Die D42A-Variante besitzt nach wie vor die Fähigkeit zur Dimerisierung, zeigt aber eine stark beeinträchtigte ATP-Hydrolyse-Rate. Dagegen sind die drei Proteine mit Mutationen im P-loop bereits in der Dimerisierung (K13A, G14V) bzw. Nukleotidbindung (K18Q) beeinträchtigt. Um die Funktionalität dieser Proteine und damit die Bedeutung des ATPase-Zyklus *in vivo* zu testen, wurden MipZ-YFP-Fusionen anstelle des endogenen WT-Proteins in *C. crescentus* synthetisiert. Die Hybridproteine waren stabil und wurden in vergleichbaren Mengen produziert (**Abbildung 2.27 B**). Zellen, die eine *yfp*-Fusion an WT-*mipZ* exprimierten, unterschieden sich weder morphologisch von WT-Zellen, noch war das Lokalisationsverhalten von MipZ verändert

(**Abbildung 2.27 A**). Die Fusion an YFP scheint somit die Aktivität von MipZ nicht zu beeinträchtigen. Im Gegensatz dazu konnten die K13A-, G14V- und K18Q-Substitutionsvarianten das WT-Protein funktionell nicht ersetzen, was sich in einer abnormalen Zellteilung äußerte. Diese führte zur Bildung von verlängerten Stielzellen und Mini-Schwärmerzellen (**Abbildung 2.27 A**) - ein Phänotyp, der ausgesprochen ähnlich zu demjenigen ist, den man beobachtet, wenn WT-MipZ ausgedünnt wird<sup>[200]</sup> (siehe **Abbildung 1.4**). Diese Beobachtung ist nicht überraschend, konnte doch bereits zuvor demonstriert werden, dass diese Varianten dimerisierungsdefizient sind und als Folge dessen nicht mehr mit FtsZ interagieren, wodurch die Determination der Zellteilungsebene dereguliert ist. Die P-loop-Varianten stellen damit eine inaktive Form von MipZ dar. Darüber hinaus zeichnen sich diese Proteine durch deutliche Veränderungen im Lokalisationsmuster aus. Obwohl alle drei Varianten immer noch befähigt sind, mit ParB zu interagieren (siehe **Abbildung 2.16**) und somit polare Komplexe zu bilden, war ein bedeutender Anteil der Proteine gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt (**Abbildung 2.27 A**). Demgegenüber, und wie zuvor bereits beschrieben<sup>[200]</sup> (**Abbildung 2.16**), zeigte die D42A-Variante kein polares Fluoreszenzsignal, sondern war stattdessen in einem leicht unregelmäßigen, wolkigen Muster über die gesamte Zelle verteilt (**Abbildung 2.27 A**). Die Induktion der Synthese dieses mutierten MipZ-Proteins führte zu einem sofortigen und kompletten Block der Zellteilung. Zusammen mit der Beobachtung, dass das D42A-Protein ein stabileres Dimer bildet als das WT-Protein und damit vorrangig in der aktiven Form vorliegt, zeigt dieser Phänotyp, dass die D42A-Mutation eine hyperaktive Form von MipZ generiert<sup>[200]</sup>. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung zusätzlich durch die Tatsache, dass der Phänotyp von Zellen, die die D42A-Variante synthetisieren, dem Phänotyp einer *mipZ*-Überexpression ähnelt<sup>[200]</sup> (siehe **Abbildung 1.4**).

Um quantitative Informationen über das Lokalisationsmuster der mutierten Proteine zu erhalten, wurden Fluoreszenzintensitätsprofile von Stämmen aufgenommen, die YFP-Fusionen an WT-MipZ bzw. dessen mutierte Varianten synthetisierten (**Abbildung 2.27 C**). Für die Analyse wurden jeweils Zellen verwendet, die eine vergleichbare Länge zu Wildtypzellen und zwei polare Fluoreszenzsignale aufwiesen. Die Auswertung von 81-115 Zellen verdeutlichte, dass WT-MipZ-YFP an den Polen konzentriert war und das Signal kontinuierlich zur Zellmitte hin abnahm, wo es ein klar definiertes Minimum bildete. Wie bereits erwähnt, zeigten die K13A-, G14V- und K18Q-Varianten im Gegensatz dazu zwar noch eine polare Akkumulation des Fluoreszenzsignals, jedoch fehlte ihnen das wohldefinierte Konzentrationsminimum in der Mitte der Zelle. Stattdessen besaßen sie vielmehr eine Art breites Plateau an delokalisierte Fluoreszenz zwischen der Zellmitte und den Polen. Übereinstimmend mit vorangegangenen Ergebnissen<sup>[200]</sup> bildete die D42A-Variante keine polaren Signale mehr und war im Durchschnitt gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. In der Summe zeigen diese Ergebnisse, dass sowohl Dimerisierung als auch ATP-Hydrolyse essentiell für die Ausbildung des MipZ-Gradienten sind.





**Abbildung 2.27: Bedeutung der ATPase-Aktivität von MipZ für die Gradientenbildung und Funktionalität *in vivo*.** (A) Die Stämme MT177 (WT), DK2 (K13A), MT178 (G14V), MT179 (K18Q) und MT197 (D42A), die WT-*mipZ* unter Kontrolle des durch Ammonium reprimierbarem  $P_{ntx}$ -Promotors und das *mipZ-yfp*-Konstrukt von dem Xylose-induzierbaren  $P_{xyr}$ -Promotor exprimierten, wurden von M2G<sub>N</sub>- in M2G-Medium mit 0,3 % Xylose überführt. Die mikroskopische Analyse erfolgte nach 8 h Inkubation. Größenstandard: 2  $\mu$ m. (B) Immunoblot-Analyse des unter (A) beschriebenen Experiments. Eine Probe jedes Stammes wurde zu Beginn des Experiments (0 h) und direkt vor der Mikroskopie (8 h) entnommen und mit einem anti-MipZ Antiserum analysiert. (C) Quantifizierung der *in vivo*-Lokalisation der MipZ-Proteine. Die Stämme MT177, DK2, MT178, MT179 und MT197 wurden für 4 h in M2G-Medium angezogen. Dies war ausreichend, um WT-MipZ aus den Zellen heraus zu verdünnen und die Fusionsproteine zu synthetisieren (Daten nicht gezeigt), ohne bereits einen Einfluss auf die Zellmorphologie zu haben. Nach der Mikroskopie wurden Stielzellen mit zwei polaren Fluoreszenzsignalen und dem Wildtyp ähnlichen Morphologie für die weitere Analyse ausgewählt. Es wurden Fluoreszenzprofile für 82-115 Zellen pro Stamm aufgenommen, auf eine Zelllänge von 1,0 normiert und gemittelt.



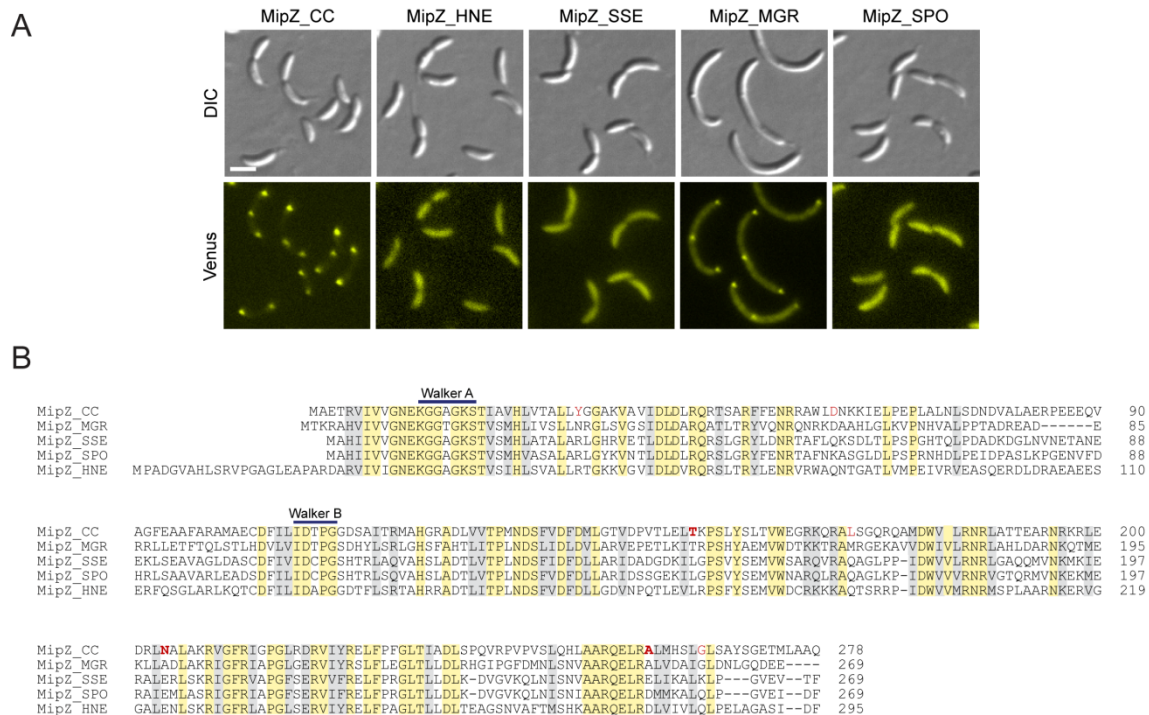
## 2.6 Der C-terminale Bereich von MipZ ist an der Interaktion mit ParB und dem Nukleoid beteiligt

In seiner aktiven, dimeren Form interagiert MipZ mit ParB, dem Nukleoid und FtsZ. Durch Wechselwirkung mit ParB einerseits und der Inhibition der Polymerisation von FtsZ andererseits koordiniert MipZ die Initiation der Zellteilung sowohl räumlich als auch zeitlich mit der Chromosomensegregation. Dabei scheint die DNA-bindende Eigenschaft von MipZ eine wichtige, wenn auch noch nicht näher charakterisierte Rolle zu übernehmen. Bislang liegen keine näheren Erkenntnisse über die Art und Weise der Interaktionen von MipZ mit seinen Bindepartnern vor. Es scheint bis dato lediglich so, dass sich die Interaktionen von MipZ mit ParB und DNA gegenseitig ausschließen. Da die Kommunikation von MipZ mit seinen Bindepartnern von zentraler Bedeutung für seine Funktion ist, war es von Interesse, die Wechselwirkung zwischen MipZ und seinen Partnern mit Hinblick auf die daran beteiligten strukturellen Regionen näher zu untersuchen.

### 2.6.1 Lokalisation von MipZ-Homologen in *C. crescentus*

Homologe von MipZ sind in vielen  $\alpha$ -Proteobakterien nachweisbar. Zunächst wurde untersucht, ob YFP-Fusionen verwandter Proteine aus vier dieser Organismen ein spezifisches Lokalisationsmuster zeigten, wenn sie in *C. crescentus* produziert wurden (**Abbildung 2.28**). Drei der vier MipZ-Homologe wiesen eine diffuse Verteilung auf, wohingegen das Protein aus *Magnetospirillum gryphiswaldense* neben einer gleichmäßigen Hintergrundfluoreszenz auch punktuelle Signale an den Polen sowie in der Zelle selbst zeigte (**Abbildung 2.28 A**). Diese Lokalisation lässt vermuten, dass das *M. gryphiswaldense*-Homolog (MGR\_4222) befähigt ist, einen Komplex mit ParB zu bilden. Darüber hinaus besaßen Zellen, die dieses Homolog synthetisierten, eine Morphologie, die sehr ähnlich zu der eines *mipZ*-Überexpressionsstammes bzw. eines Stammes war, der die D42A-Substitutionsvariante anstelle des WT-Proteins produzierte. Dies deutet darauf hin, dass das Protein zudem mit FtsZ wechselwirkte und dadurch die Zellteilung inhibierte. Interessanterweise war MGR\_4222 im Stande, die Zellteilung in Gegenwart des endogenen MipZ von *C. crescentus* zu inhibieren, was wahrscheinlich auf einen Dosiseffekt zurückzuführen ist.

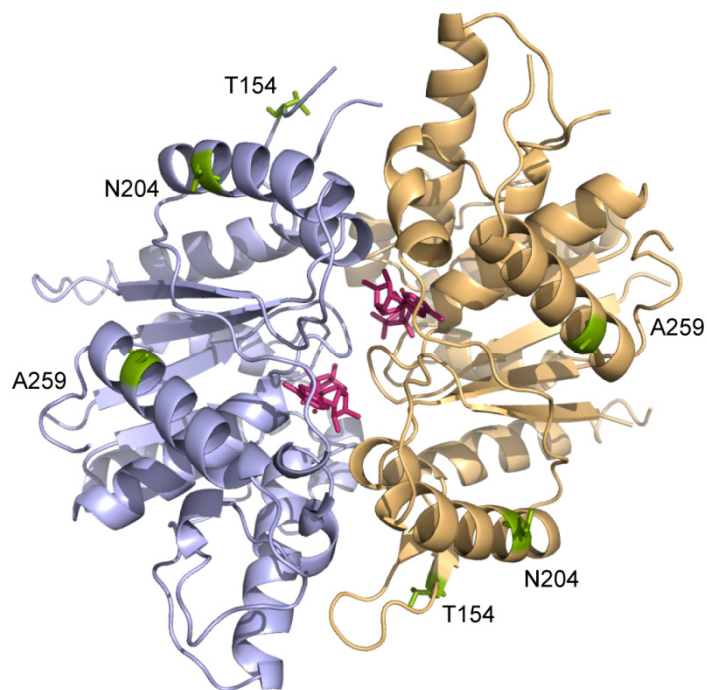
Da nur das MipZ-Protein aus *M. gryphiswaldense* ein distinktes Lokalisationsmuster aufwies und die Zellteilung von *C. crescentus* beeinflusste, die anderen drei Homologe jedoch nicht funktionell zu sein schienen, wurde mit Hilfe eines Sequenzvergleichs dieser Proteine nach Aminosäuren gesucht, die in den *C. crescentus*- und *M. gryphiswaldense*-Proteinen identisch bzw. ähnlich waren und sich gleichzeitig von denen in den anderen drei Organismen deutlich unterschieden (**Abbildung 2.28 B**). Auf diese Weise wurden sieben Aminosäuren identifiziert, wobei die genauere Analyse auf drei Reste beschränkt wurde: T154, N204 und A259.



**Abbildung 2.28: Heterologe Expression von *mipZ*-Homologen in *C. crescentus*.** (A) Die Stämme MT83 ( $P_{xyI}$ -*mipZ*-yfp), SW1 ( $P_{xyI}$ -*HNE*\_1128-yfp), SW2 ( $P_{xyI}$ -*SSE*37\_15521-yfp), SW3 ( $P_{xyI}$ -*MGR*\_4222-yfp) und SW4 ( $P_{xyI}$ -*SPO*\_0689-yfp), die entweder *C. crescentus*-MipZ oder dessen Homologe aus *Hyphomonas neptunium* (MipZ\_HNE), *Sagittula stellata* (MipZ\_SSE), *Magnetospirillum gryphiswaldense* (MipZ\_MGR) oder *Ruegeria pomeroyi* (MipZ\_SPO) unter Kontrolle des Xylose-induzierbaren Promotors  $P_{xyI}$  synthetisieren, wurden für 4 h in Gegenwart von 0,3 % Xylose gezogen und anschließend mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Größenstandard: 2  $\mu$ m. (B) Sequenzvergleich von *C. crescentus*-MipZ (AAK24136) und der homologen Proteine aus *M. gryphiswaldense* (CAM78154), *S. stellata* (EBA06305), *R. pomeroyi* (AAV93997) und *H. neptunium* (ABI75406), erstellt mittels MAFFT v6<sup>[96]</sup>. Identische Aminosäurereste sind gelb, ähnliche sind grau hinterlegt. Die Lage der Walker A und Walker B-Boxen ist markiert. Aminosäuren, die sowohl in *C. crescentus*- als auch *M. gryphiswaldense*-MipZ identisch bzw. ähnlich sind, sich aber deutlich von denen der anderen drei Homologe unterscheiden, sind rot markiert. Reste, die für eine genauere Analyse herangezogen wurden, sind zusätzlich fett gedruckt (T154, N204 und A259).

## 2.6.2 Identifizierung von drei für die Funktion potentiell bedeutenden Resten in MipZ

Mit Hilfe der heterologen Expression und anschließender Lokalisationsanalyse von *mipZ*-Homologen in *C. crescentus* wurden drei für die Funktion potentiell bedeutende Aminosäuren in MipZ identifiziert: T154, N204 und A259. Alle drei Reste liegen an der Oberfläche von MipZ und sind somit für eine potentielle Interaktion mit einem Bindepartner zugänglich (Abbildung 2.29). Der Threoninrest an Position 154 (T154) ist Teil eines ungewöhnlichen strukturellen Motivs, eines kurzen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts (S6/S7), welches eine große Schleife stabilisiert. Der Asparaginrest N204 sowie der Alaninrest A259 dagegen bilden zusammen mit weiteren Resten die Helices 8 bzw. 10, die sich in einer Region mit hoher positiver Ladungsdichte befinden (Vergleich Abbildung 2.1 B) und aufgrund dessen eine potentielle DNA-bindende Oberfläche bilden könnten.



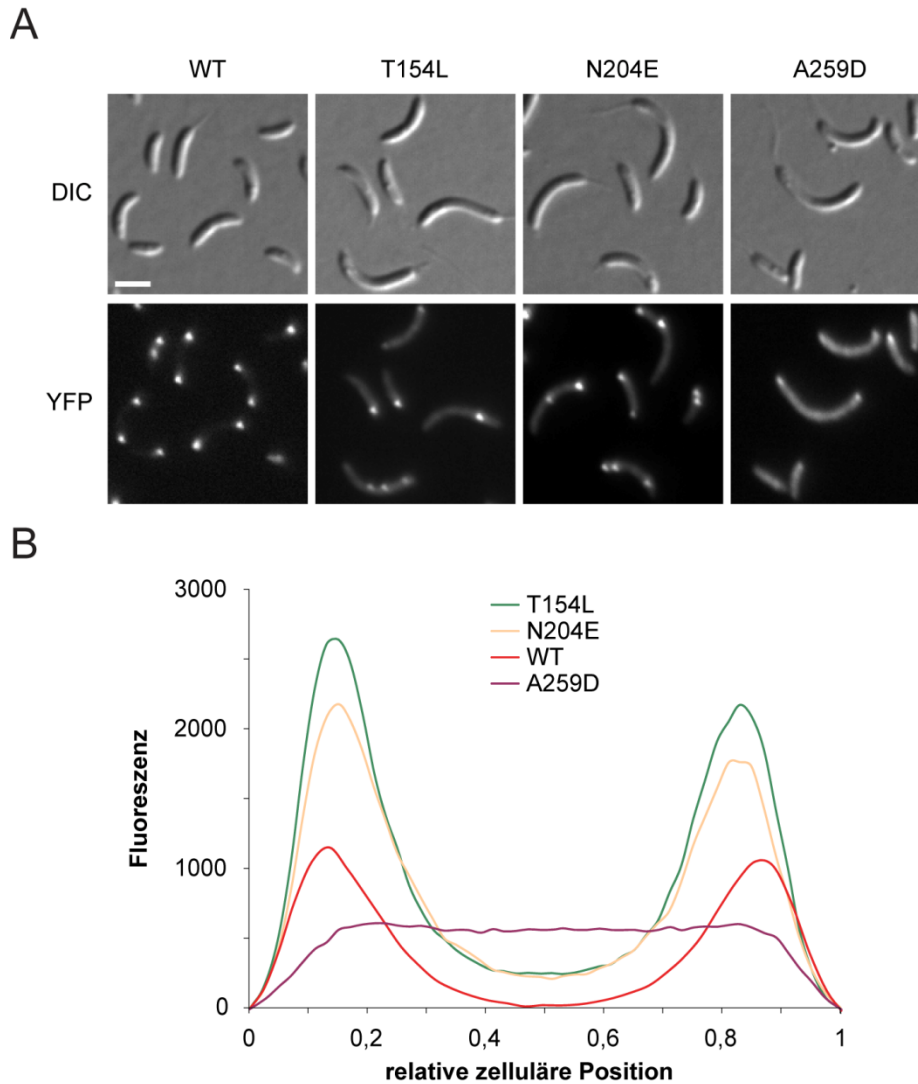
**Abbildung 2.29: Räumliche Position spezifischer Reste in der Struktur von MipZ.** Dargestellt ist die dimere, ATP $\gamma$ S-gebundene Form der D42A-Variante von MipZ (PDB 2XJ9). Die drei näher untersuchten Aminosäuren T154, N204 und A259 im C-terminalen Bereich von MipZ sind grün hervorgehoben (erstellt mit PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r1, Schrödinger, LLC).

Um Aufschluss über die Bedeutung dieser Reste für die Funktion von MipZ zu erlangen, wurden die Aminosäuren gegen die entsprechenden Reste ausgetauscht, die in den in *C. crescentus* nicht funktionellen MipZ-Homologen zu finden waren. Das bedeutet, es wurden folgende Mutationen eingeführt: T154L, N204E bzw. A259D.

Zunächst wurde die Lokalisation sowie die Fähigkeit dieser mutierten Proteine analysiert, den Verlust von WT-MipZ zu komplementieren, indem Fusionen dieser Varianten an ein gelb fluoreszierendes Protein anstelle von endogenem MipZ synthetisiert wurden (**Abbildung 2.30**). Die Produktion jedes der mutierten Proteine resultierte in der Bildung von verlängerten Stielzellen, was bereits darauf hindeutet, dass die räumliche Regulation der Zellteilung behindert war (**Abbildung 2.30 A**). Eine beeinträchtigte Funktionalität der Substitutionsvarianten war zusätzlich in ihrem Lokalisationsmuster erkennbar, denn keines dieser Proteine bildete einen typischen WT-Gradienten aus (**Abbildung 2.30 B**). Die T154L- und N204E-Varianten zeigten zwar immer noch eine WT-MipZ ähnliche Verteilung, jedoch war in Zellen, die eines dieser Proteine synthetisierten, ein signifikantes Fluoreszenzsignal ebenfalls in der Zellmitte zu detektieren, während WT-MipZ dort nicht zu finden war. Im Gegensatz dazu war die Fluoreszenz der A259D-Variante zum größten Teil diffus in der Zelle verteilt, obwohl auch hier ein, wenn auch schwaches, polares Fluoreszenzsignal detektierbar war.

Wie im Nachhinein festgestellt wurde, wurde das WT-Protein als YFP-Fusion synthetisiert, während die drei mutierten Varianten als Venus-Fusionen produziert wurden. Venus ist eine weiterentwickelte Version von YFP mit einer beschleunigten Faltung und Reifung des Chromophors und einer erhöhten Quantenausbeute<sup>[148]</sup>. Die verschiedenen, verwendeten Fluoreszenzproteine liefern auch eine Erklärung dafür, dass die Fluoreszenzsignale der mutierten

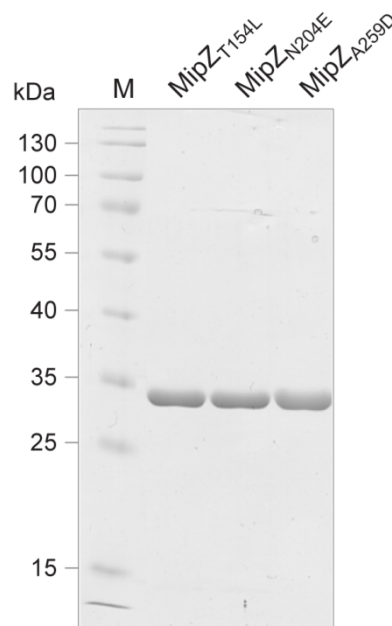
MipZ-Proteine deutlich größer als das von WT-MipZ waren. Übereinstimmend mit einer erhöhten Stabilität von Venus im Vergleich zu YFP lagen die Substitutionsvarianten darüber hinaus in größerer Molekülzahl in der Zelle vor (Daten nicht gezeigt). Um das Lokalisationsverhalten dieser MipZ-Varianten eindeutig beurteilen zu können, muss somit die Lokalisation einer WT-MipZ-Venus-Fusion analysiert werden.



**Abbildung 2.30: Effekt von Aminosäuresubstitutionen im C-terminalen Bereich auf die Lokalisation und Funktion von MipZ.** (A) Die Stämme MT177 (WT), SW12 (T154L), SW13 (N204E) und SW15 (A259D), die WT-*mipZ* unter Kontrolle des durch Ammonium reprimierbaren  $P_{ntrX}$ -Promotors und das *mipZ-yfp*- (WT) bzw. das *mipZ-venus*-Konstrukt (T154L, N204E, A259D) von dem Xylose-induzierbaren  $P_{xyf}$ -Promotor exprimierten, wurden von M2G<sub>N</sub><sup>-</sup> in M2G-Medium mit 0,3 % Xylose überführt. Die mikroskopische Analyse erfolgte nach 8 h Inkubation. Größenstandard: 2 µm. (B) Quantifizierung der *in vivo*-Lokalisation der MipZ-Proteine. Die Stämme MT177, SW12, SW13 und SW15 wurden für 4 h in M2G-Medium gezogen. Dies war ausreichend, um WT-MipZ aus den Zellen auszuverdünnen und die Fusionsproteine zu synthetisieren (Daten nicht gezeigt), ohne bereits Einfluss auf die Zellmorphologie zu haben. Nach der Mikroskopie wurden Stielzellen mit zwei polaren Fluoreszenzsignalen und einer dem Wildtyp ähnlichen Morphologie für die weitere Analyse ausgewählt. Es wurden Fluoreszenzprofile für 95-139 Zellen pro Stamm aufgenommen, auf eine Zelllänge von 1,0 normiert und gemittelt.

### 2.6.3 Der ATPase-Zyklus und die Interaktion mit FtsZ werden durch die Aminosäuresubstitutionen nicht beeinflusst

Keine der MipZ-Varianten mit Substitutionen im C-terminalen Bereich (weitergehend als C-terminale Mutanten bezeichnet) ist in der Lage, den Verlust des WT-Proteins zu komplementieren, wie an der abnormalen Morphologie der entsprechenden Stämme sichtbar ist. Allerdings könnte der beobachtete Phänotyp vor allem von Zellen, die die T154L bzw. N204E Varianten synthetisierten, ebenso auf der leichten Überproduktion dieser Proteine beruhen. Um die biochemischen Eigenschaften dieser Proteine dennoch näher zu untersuchen, wurden auch diese MipZ-Varianten mittels eines C-terminalen Histidinaffinitätspeptids gereinigt (**Abbildung 2.31**) und biochemisch charakterisiert.

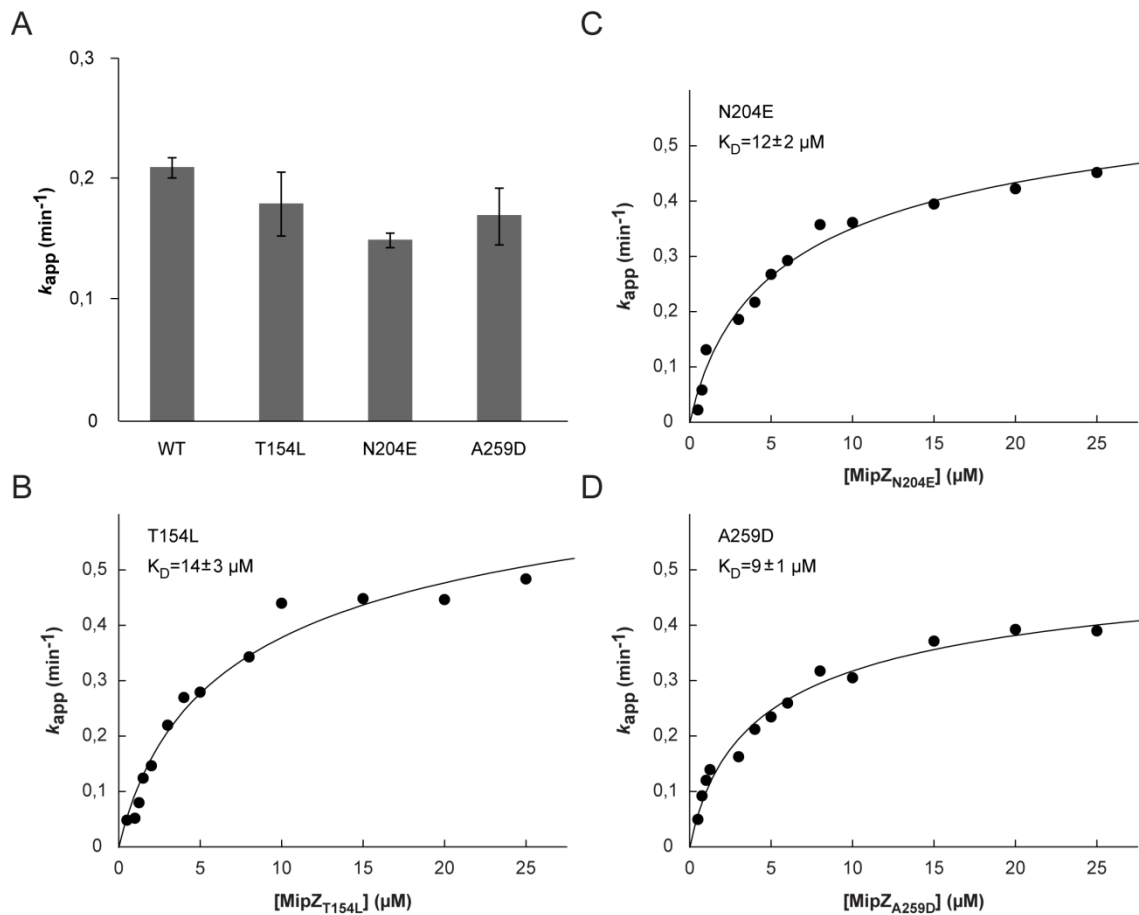


**Abbildung 2.31: Gereinigte C-terminale MipZ-Varianten.** Je 3 µg der nach der Reinigung erhaltenen Proteinlösungen wurden auf ein 11 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Blau gefärbt.

In einem ersten Schritt konnte mittels einer Stopped-Flow-Analyse nachgewiesen werden, dass die eingeführten Mutationen die Nukleotidbindung nicht beeinträchtigen. Alle Proteine banden ATP und ADP mit ähnlicher Affinität wie WT-MipZ (**Tabelle 2.2**). Ein anschließender radioaktivitätsbasierter ATPase-Aktivitätstest zeigte, dass die ATP-Hydrolyseraten ebenfalls mit der von WT-MipZ vergleichbar waren (**Abbildung 2.32 A**), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Mutationen die Dimerisierung nicht beeinträchtigen. Bestätigt wurde dies durch Bestimmung der katalytischen Aktivität in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (**Abbildung 2.32 B-D**). Aus diesen Experimenten konnte, wie unter Abschnitt 2.3 beschrieben, die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  der Dimerisierung extrahiert werden, die für alle drei Varianten sehr ähnlich zu der von WT-MipZ war (**Tabelle 2.2**). Betrachtet man die räumliche Lage der Reste, weit entfernt von der Dimerisierungsoberfläche, so war ein Einfluss dieser Mutationen auf die Dimerisierung auch nicht unmittelbar zu erwarten.

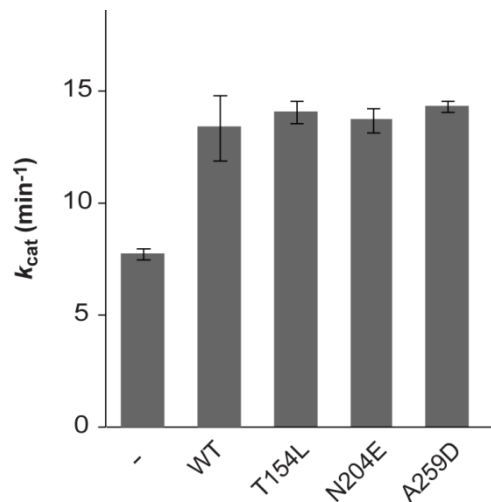
**Tabelle 2.2:** Kinetische Parameter der Interaktion der C-terminalen MipZ-Varianten mit mant-Nukleotiden

Protein	$k_{\text{ass}}$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{diss}}$ ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>b</sup>
<b>mant-ATP</b>			
T154L	$6,6 \cdot 10^4$	2,2	34
N204E	$7,0 \cdot 10^4$	2,2	31
A259D	$6,1 \cdot 10^4$	2,2	36
<b>mant-ADP</b>			
T154L	$10,5 \cdot 10^4$	3,0	29
N204E	$9,0 \cdot 10^4$	2,8	31
A259D	$9,2 \cdot 10^4$	3,0	33

<sup>a</sup> gemessen mittels eines Verdrängungsexperiments<sup>b</sup> aus Geschwindigkeitskonstanten hergeleitet ( $K_D = k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$ )

**Abbildung 2.32: Intrinsische ATPase-Aktivitäten der C-terminalen MipZ-Varianten.** (A) Je 6  $\mu\text{M}$  Protein wurden mit 1 mM  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  inkubiert und die gebildete Menge an  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ADP}$  pro Minute und eingesetzter Proteinkonzentration ermittelt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen ( $\pm$  SD). (B-D) Konzentrationsabhängigkeit der ATPase-Aktivität von (B) T154L, (C) N204E und (D) A259D. Die ATPase-Aktivität ( $k_{\text{app}}$ ) für verschiedene Proteinkonzentrationen wurde in Gegenwart von 2 mM  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  bestimmt. Die Beschreibung der Daten durch ein Modell, das  $k_{\text{app}}$  in Relation zur Dimerkonzentration setzt (siehe Abschnitt 2.3), ergab die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  für den dimeren Komplex und die katalytische Aktivität ( $k_{\text{cat}}$ ). Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus jeweils zwei unabhängigen Messungen.

Eine Analyse der GTPase-Aktivität von FtsZ in Gegenwart der C-terminalen MipZ-Varianten zeigte, dass die MipZ-vermittelte Stimulation der GTP-Hydrolyse durch die eingeführten Mutationen nicht beeinträchtigt war (**Abbildung 2.33**). In Übereinstimmung damit war für jedes der Proteine mittels SPR die Ausbildung eines Komplexes mit FtsZ zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Somit ist davon auszugehen, dass keiner der mutierten Reste direkt an der Interaktion mit FtsZ beteiligt ist.

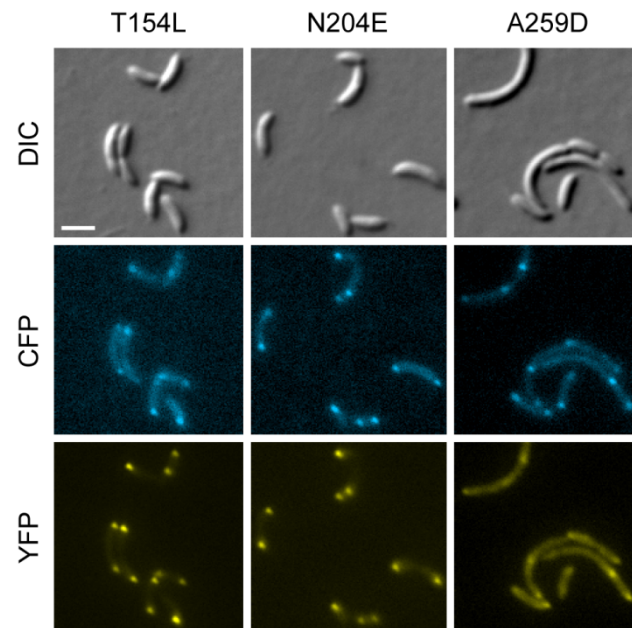


**Abbildung 2.33: Stimulation der GTPase-Aktivität von FtsZ durch C-terminale MipZ-Varianten.** FtsZ (3  $\mu$ M) wurde mit 2 mM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP und 1 mM ATP ohne zusätzliches Protein (-) oder in Gegenwart des angegebenen MipZ-Proteins (je 6  $\mu$ M) inkubiert. Gezeigt ist die GTPase-Aktivität  $k_{cat}$  von FtsZ unter den verschiedenen Bedingungen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Messungen ( $\pm$  SD).

#### 2.6.4 MipZ interagiert über seinen C-terminalen Bereich mit ParB

Bezüglich der Dimerisierung und ATP-Hydrolyse sowie der Stimulation von FtsZ verhielten sich die T154L-, N204E- und A259D-Varianten ähnlich wie WT-MipZ. Um zu untersuchen, ob dies auch auf die Interaktion mit ParB zutrifft, wurde zunächst eine *in vivo*-Kokolokalisationsstudie mit ParB durchgeführt (**Abbildung 2.34**). Wie bereits vermutet, überlappten die punktuellen Fluoreszenzsignale der entsprechenden Venus-Fusionen mit denen einer CFP-ParB-Fusion, so dass auch diese Substitutionsvarianten noch in der Lage zu sein schienen, mit ParB zu interagieren. Allerdings wies das A259D-Protein im Vergleich zu den anderen Varianten ein schwächeres, punktförmig konzentriertes Signal auf und zeigte stattdessen eine verstärkte, diffuse Hintergrundfluoreszenz, was darauf hindeuten könnte, dass dieses Protein in seiner Bindung an ParB beeinträchtigt sein könnte.

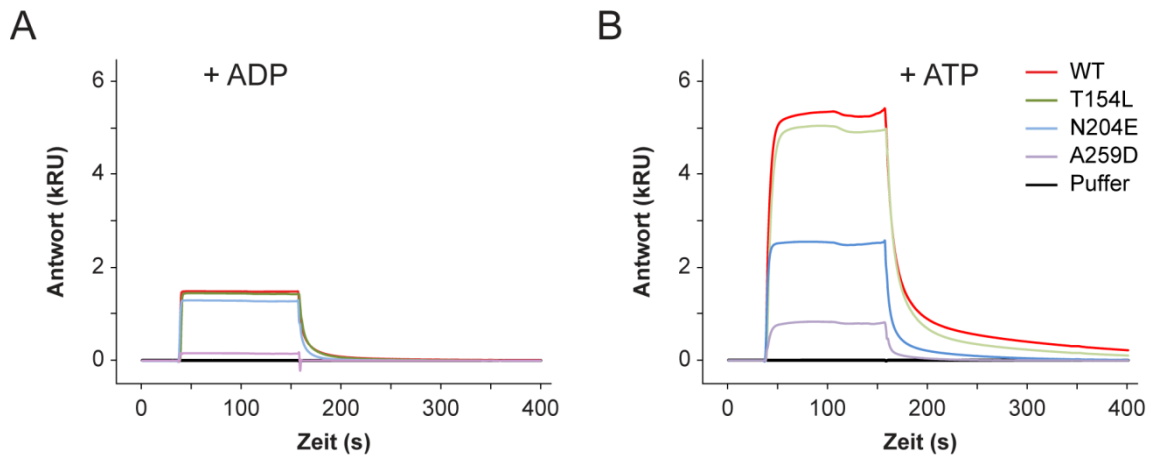




**Abbildung 2.34: In vivo-Kolokalisation von Venus-Fusionen der C-terminalen MipZ-Varianten mit CFP-ParB.** Die Stämme DK8 (T154L), DK9 (N204E) und DK10 (A259D), die WT-*mipZ* unter Kontrolle des durch Ammonium reprimierbaren  $P_{nrx}$ -Promotors, das *mipZ-venus* Konstrukt von dem Xylose-induzierbaren  $P_{xyf}$ -Promotor und *cfp-parB* unter Kontrolle des Inositol-induzierbaren  $P_{iol}$ -Promotors<sup>[14]</sup> exprimierten, wurden von M2G<sub>N</sub>- in M2G-Medium überführt. Dem Medium wurden je 0,3 % Xylose und 0,3 % Inositol zugesetzt. Nach 8 h Inkubation wurden die Zellen mittels DIC- und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Größenstandard: 2  $\mu$ m

Zur näheren biochemischen Charakterisierung der Wechselwirkung dieser Varianten mit ParB wurden SPR-Analysen mit immobilisiertem ParB als Liganden durchgeführt (**Abbildung 2.35**). Während die T154L-Mutation keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung von MipZ an ParB hatte, zeigte die N204E-Variante eine deutlich reduzierte Interaktion mit ParB im dimeren Zustand (+ATP), die im monomeren Zustand (+ADP) nicht detektierbar war. Die A259D-Mutation hatte einen noch stärkeren Effekt auf die MipZ-ParB-Wechselwirkung. Das Protein, das diesen Aminosäureaustausch trug, war sowohl im monomeren als auch im dimeren Zustand stark in seiner Fähigkeit, mit ParB zu interagieren, beeinträchtigt. Das unterstützt das beobachtete Lokalisationsmuster der entsprechenden Venus-Fusion (siehe **Abbildung 2.34**). Um allerdings auf die Affinitäten der MipZ-ParB-Interaktionen schließen zu können, sind genauere Untersuchungen nötig. Zusammen weisen diese Ergebnisse jedoch bereits darauf hin, dass der Alaninrest an Position 259 bzw. Helix 10 sowie Helix 8 an der MipZ-ParB-Interaktion beteiligt sind.

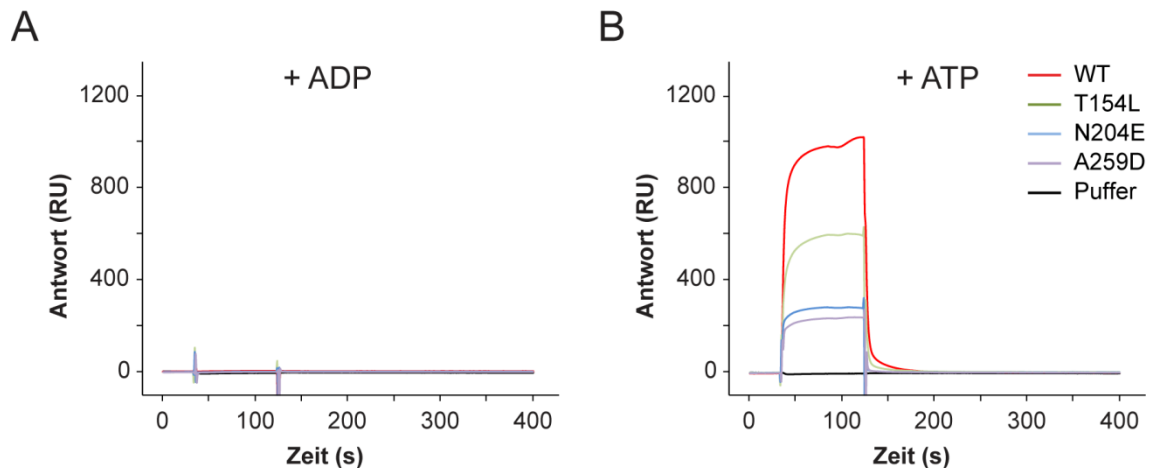




**Abbildung 2.35: Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse der Interaktion der C-terminalen MipZ-Varianten mit ParB.** ParB wurde auf einem CM5-Chip immobilisiert (3800 RU). Anschließend wurden die angegebenen MipZ-Proteine (je 6  $\mu$ M) **(A)** in Gegenwart von 1 mM ADP und **(B)** in Gegenwart von 1 mM ATP über die modifizierte Oberfläche geschickt. In Abwesenheit von Nukleotiden wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie unter (A) dargestellt (Daten nicht gezeigt).

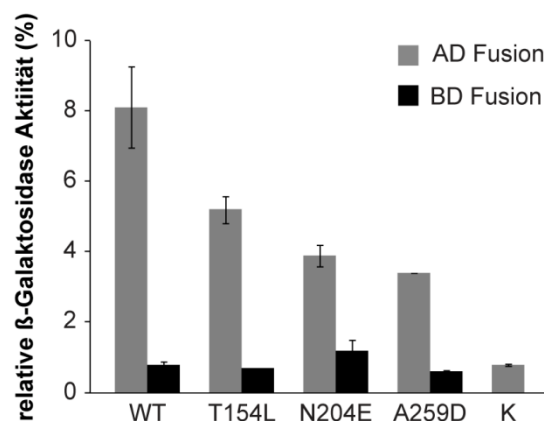
### 2.6.5 Die Interaktionsdomänen für ParB und DNA überlappen

Die Auswirkungen der eingeführten Substitutionen auf die DNA-Bindefähigkeit der Proteine wurden ebenfalls mittels SPR untersucht (**Abbildung 2.36**). Wie zuvor bereits gezeigt, besitzt MipZ in der ADP-gebundenen, monomeren Form keine Affinität für DNA (**Abbildung 2.36 A**). Dagegen erlangten alle drei Varianten in Anwesenheit von ATP die Fähigkeit zur DNA-Bindung, obwohl vor allem die N204E- und A259D-Varianten dabei eine deutlich kleinere Antwort als WT-MipZ hervorriefen (**Abbildung 2.36 B**). Im Zusammenhang mit den SPR-Ergebnissen zur ParB-Interaktion, nach denen die N204E- und A259D-Proteine ebenfalls die geringste Antwort induzierten, lässt das vermuten, dass die Regionen in MipZ, die mit ParB und DNA wechselwirken, zumindest teilweise überlappen und dass diese die Helices 8 und 10 mit einbeziehen.



**Abbildung 2.36: Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse der Interaktion der C-terminalen MipZ-Varianten mit DNA.** Ein 26 bp langes, doppelsträngiges Oligonukleotid (ran2) wurde auf einem SA-Chip immobilisiert (500 RU). Anschließend wurden die angegebenen MipZ-Proteine (je 6  $\mu$ M) (A) in Gegenwart von 1 mM ADP und (B) in Gegenwart von 1 mM ATP über die modifizierte Oberfläche geschickt. In Abwesenheit von Nukleotiden wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie unter (A) dargestellt (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Ergebnisse wurden darüber hinaus für die Oligonukleotide *parS<sub>WT</sub>*, *parS<sub>mt</sub>* und *ran1* erhalten (Daten nicht gezeigt).

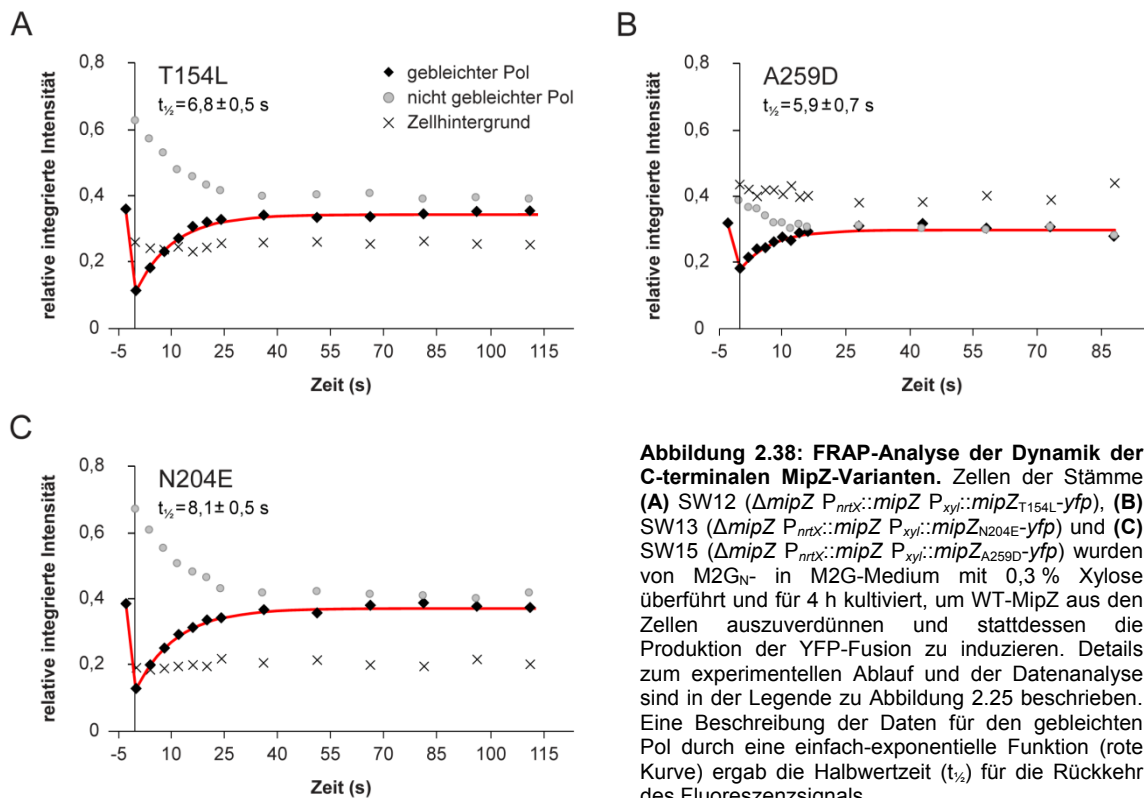
Unterstützt wurden die Resultate der SPR-Analyse durch eine Hefe-Ein-Hybrid-Analyse, in der Fusionen mit der Transaktivierungsdomäne des GAL4-Proteins, bedingt durch die DNA-bindenden Eigenschaften der MipZ-Proteine, zu einer Induktion der Expression des *lacZ*-Gens führten (Abbildung 2.37). Unter der Annahme, dass die gemessenen Aktivitäten proportional zur synthetisierten Enzymmenge sind, war die Produktion der  $\beta$ -Galaktosidase in Stämmen, die Fusionen der C-terminalen Varianten herstellten, im Vergleich zu WT-MipZ reduziert. Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass die DNA-Bindedomäne von MipZ durch die Dimerisierung vervollständigt wird und diese von Regionen im C-terminalen Bereich des Proteins gebildet werden.



**Abbildung 2.37: Detektion der DNA-Bindeaktivität der C-terminalen MipZ-Varianten durch Hefe-Ein-Hybrid-Analyse.** Hefestämme, die Fusionen von MipZ und dessen Varianten an die Transaktivierungsdomäne (AD) bzw. die Bindedomäne (BD) des GAL4-Transkriptionsregulators produzieren, wurden auf die Expression des *lacZ*-Gens getestet. Die Aktivitäten wurden auf einen Stamm, der das komplette GAL4-Protein synthetisierte, normalisiert. Als Negativkontrolle (K) diente ein Stamm, der allein die physikalisch getrennten GAL4-Transaktivierungs- und Bindedomänen produzierte. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Messungen ( $\pm$  SD).

### 2.6.6 Verifizierung der durch DNA-Bindung reduzierten MipZ-Dynamik

Da die DNA-Bindung des MipZ-Dimers die *in vivo*-Diffusionsrate reduzierte und die C-terminalen Varianten in ihrer Interaktion mit DNA beeinträchtigt waren, wurde vermutet, dass diese Proteine eine im Vergleich zu WT-MipZ ( $t_{1/2} = 10,7$  s) beschleunigte Mobilität aufweisen könnten. Tatsächlich wurde für jede MipZ-Variante in FRAP-Experimenten beobachtet, dass das Fluoreszenzsignal eines gebleichten polaren Komplexes schneller zurückkehrte, als das für WT-MipZ geschah (**Abbildung 2.38**). Die quantitative, zeitaufgelöste Analyse ergab für T154L eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von  $6,8 \pm 0,5$  s ( $n=30$  Zellen), für N204E  $8,1 \pm 0,5$  s ( $n=28$  Zellen) und für A259D  $5,9 \pm 0,7$  s ( $n=19$  Zellen). Diese Werte korrelieren gut mit den beobachteten, verringerten Affinitäten für DNA und unterstützen die Vorstellung, dass die Interaktion von MipZ mit dem Nukleoid die *in vivo*-Dynamik des Proteins beeinflusst.



**Abbildung 2.38: FRAP-Analyse der Dynamik der C-terminalen MipZ-Varianten.** Zellen der Stämme (A) SW12 ( $\Delta mipZ$   $P_{nrtX}::mipZ$   $P_{xyl}::mipZ_{T154L}-yfp$ ), (B) SW13 ( $\Delta mipZ$   $P_{nrtX}::mipZ$   $P_{xyl}::mipZ_{N204E}-yfp$ ) und (C) SW15 ( $\Delta mipZ$   $P_{nrtX}::mipZ$   $P_{xyl}::mipZ_{A259D}-yfp$ ) wurden von M2G<sub>N</sub> in M2G-Medium mit 0,3 % Xylose überführt und für 4 h kultiviert, um WT-MipZ aus den Zellen auszuverdünnen und stattdessen die Produktion der YFP-Fusion zu induzieren. Details zum experimentellen Ablauf und der Datenanalyse sind in der Legende zu Abbildung 2.25 beschrieben. Eine Beschreibung der Daten für den gebleichten Pol durch eine einfach-exponentielle Funktion (rote Kurve) ergab die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) für die Rückkehr des Fluoreszenzsignals.



## 3 DISKUSSION

### 3.1 Modell zur Gradientenbildung von MipZ

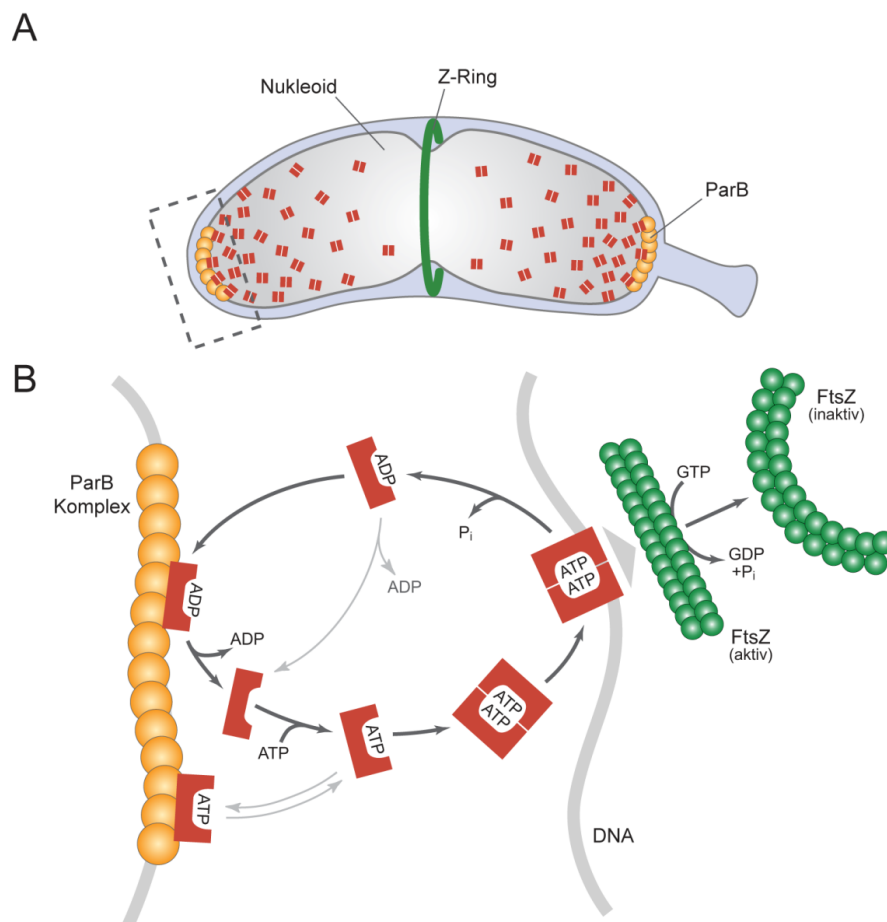
Das MipZ-System ist das erste Beispiel für einen Proteingradienten in einer prokaryotischen Zelle. In einer Zelle kurz vor der Teilung formt MipZ einen bipolaren Konzentrationsgradienten, mit Maxima an den Polen und einem definierten Minimum in der Zellmitte. Indem es als Inhibitor der FtsZ-Assemblierung die Ausbildung des Z-Rings auf die Zellmitte beschränkt, übernimmt MipZ eine zentrale Rolle in der Regulation der Zellteilung von *C. crescentus* und wahrscheinlich auch in anderen  $\alpha$ -Proteobakterien. In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus, der der Gradientenbildung zugrunde liegt, mit Hilfe verschiedener Substitutionsvarianten von MipZ charakterisiert.

Die Daten demonstrieren, dass die *in vivo*-Verteilung von MipZ in einem Konzentrationsgradienten auf zwei Voraussetzungen beruht. Zum einen ist dies der nukleotidabhängige Wechsel zwischen einer monomeren und einer dimeren Form, welcher durch die ATPase-Aktivität angetrieben wird. Weder die im monomeren Zustand arretierten P-loop Mutanten (K13A, G14V, K18Q) noch die konstitutiv dimere D42A-Variante bilden das für das WT-Protein typische Konzentrationsprofil aus (**Abbildung 2.27**). Zum anderen besitzen monomeres und dimeres MipZ verschiedene Interaktionsnetzwerke und dadurch bedingt unterschiedliche Mobilitäten *in vivo*. MipZ interagiert konstitutiv mit ParB und wird dadurch zu den Polen rekrutiert; eine Ausdünnung von ParB führt zu einer gleichmäßigen Verteilung von MipZ in der Zelle<sup>[200]</sup>. Dimeres MipZ dagegen, das wahrscheinlich in den polaren Bereichen gebildet wird, bindet unspezifisch an DNA, wodurch die Diffusion dieser Spezies im Vergleich zu monomerem MipZ verlangsamt wird (**Abbildung 2.25**). Als Konsequenz ist das Verhältnis zwischen Monomeren und Dimeren an den Polen und im Rest der Zelle unterschiedlich und ein Konzentrationsgradient bildet sich aus.

Im Einzelnen beinhaltet das Modell zum Mechanismus des Aufbaus des MipZ-Gradienten folgende Schritte (**Abbildung 3.1**): Sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-Analysen zeigen, dass MipZ in seiner monomeren Form mit ParB interagiert und dadurch zu den Polen rekrutiert wird (**Abbildung 2.15** und **Abbildung 2.16**). Übereinstimmend mit einer Affinität im mikromolaren Bereich<sup>[200]</sup> ist der MipZ-ParB-Komplex hochdynamisch und tauscht Untereinheiten innerhalb weniger Sekunden aus (**Abbildung 2.26**). Die Bindung von ATP ermöglicht die Dimerisierung zweier MipZ-Monomere. Durch die Rekrutierung des MipZ-Monomers zum *parS*/ParB-Komplex findet dieser Prozess in den polaren Bereichen statt. Das MipZ-Dimer kann sowohl mit ParB als auch DNA in Wechselwirkung treten (**Abbildung 2.15** und **Abbildung 2.20**). Diese Interaktionen schließen sich jedoch gegenseitig aus, denn MipZ besitzt überlappende Bindestellen für beide Interaktionspartner (**Abbildung 2.35** und **Abbildung 2.37**). Da das Nukleoid eine weitaus größere Konzentration an Bindestellen für das Dimer bereitstellt als ParB, welches darüber hinaus ebenso mit MipZ-Monomeren interagiert, bindet das MipZ-Dimer bevorzugt an die DNA. Die Assoziation mit dem Nukleoid verlangsamt die Diffusion des Dimers, wodurch die meisten Dimere in der Nähe des Pols verbleiben. Auf diese Weise wirkt das Nukleoid als Filter, das nur wenigen MipZ-Dimeren erlaubt, weiter in Richtung Zellmitte zu diffundieren, bevor sie an die DNA binden. Die Konzentration des MipZ-DNA-Komplexes nimmt somit als Funktion des Abstands vom Pol ab.

Die intrinsische ATPase-Aktivität von MipZ führt schließlich zum Zerfall des Dimers (**Abbildung 3.1**) und wirkt so als Schrittmacher, der die Halbwertszeit für das Bestehen des Dimers bestimmt und sicherstellt, dass MipZ-Moleküle regelmäßig in die ADP-gebundene, monomere Form zurückkehren. Bevor diese Moleküle erneut Dimere bilden können, muss das ADP gegen ATP ausgetauscht werden. Als Konsequenz verbleiben MipZ-Moleküle für einen definierten Zeitraum in der monomeren Form, während der sie zum polaren *parS*/ParB-Komplex zurückdiffundieren können.

Zusammenfassend kann der MipZ-Gradient somit als eine asymmetrische Verteilung von MipZ-Dimeren betrachtet werden, die ausgehend von einem polaren Pool an Monomeren gebildet werden und anschließend, verlangsamt durch die Assoziation mit dem Nukleoid, in Richtung Zellmitte diffundieren, bevor sie aufgrund der ATP-Hydrolyse zerfallen. An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass nur das Dimer die biologisch aktive Form darstellt und mit FtsZ interagiert, wohingegen monomeres MipZ keinen Einfluss auf die GTPase-Aktivität und somit Polymerisation von FtsZ ausübt<sup>[200]</sup> (**Abbildung 2.14**). Die Verteilung von Nukleoid-assoziierten MipZ-Dimeren in einem Gradienten enthält so die räumliche Information für die Assemblierung des Divisoms in der Zellmitte.



**Abbildung 3.1: Modell für die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten von MipZ.** (A) Die Verteilung von MipZ-Dimeren entlang des Nukleoids in einer Zelle kurz vor der Teilung. Dimere bilden sich in der Nähe des ParB-Komplexes und werden aufgrund der unspezifischen Interaktion mit chromosomaler DNA in den polaren Bereichen festgehalten. Das Rechteck markiert eine Region, die in (B) vergrößert dargestellt ist. (B) Die Nukleotid-abhängige Zirkulation von MipZ zwischen dem polaren *parS*/ParB-Komplex und chromosomaler DNA. Zur näheren Erläuterung siehe Text. (Kiebusch et al., in Vorbereitung)

Das eben beschriebene Modell basiert auf den im Ergebnisteil präsentierten *in vivo*- und *in vitro*-Daten. Es ist jedoch ungewiss, ob dieses Modell tatsächlich einen Gradienten generiert, wie ihn MipZ *in vivo* ausbildet. Die Klärung dieser Frage erfordert die Durchführung einer mathematischen Analyse des Modells. Sie könnte z.B. Aufschluss darüber geben, ob der polare *parS*/ParB-Komplex eine Rolle bei der Dimerisierung von MipZ spielt. Derzeit gibt es keine Hinweise darauf, dass ParB aktiv den ATPase-Zyklus von MipZ oder das Verhältnis von Monomeren zu Dimeren beeinflusst. ParB stimuliert weder die ATP-Hydrolyse (**Abbildung 2.13**), noch den Nukleotidaustausch von MipZ. Im Gegensatz dazu übt ParB jedoch einen stimulierenden Effekt auf die enzymatische Aktivität der verwandten P-loop-ATPase ParA<sup>[7,114,184]</sup> bzw. auf deren Nukleotidaustausch aus<sup>[41]</sup> und beeinflusst so den oligomeren Zustand von ParA<sup>[7,165-166]</sup>. Die Vermutung erscheint somit begründet, dass ParB ebenso den ATPase-Zyklus von MipZ und damit dessen Gradientenbildung aktiv beeinflussen könnte. Eine Annahme in dem oben beschriebenen Modell ist, dass die Dimerbildung an den Polen erfolgt. Es wäre denkbar, dass ParB die Dimerisierung stimuliert, indem es als Katalysator fungiert. Zusammen mit der DNA-bindenden Eigenschaft der Dimere würde ParB so das Gleichgewicht auf deren Seite verschieben. Eine Messung der ATPase-Aktivität von MipZ in Gegenwart von DNA sowie variierender Konzentrationen an ParB könnte Aufschluss über die Richtigkeit dieser Annahme geben. Obwohl eindeutig ParB für die Lokalisation von MipZ nötig ist, ist ferner nicht auszuschließen, dass MipZ eventuell mit einem weiteren Faktor am Pol interagiert, der einen Einfluss auf den ATPase-Zyklus von MipZ ausübt.

Darüber hinaus deuten erste *in vivo*-Ergebnisse mit MipZ-Varianten, in denen Aminosäuren substituiert wurden, die intermolekulare Wechselwirkungen im Dimer vermitteln, darauf hin, dass die Länge des MipZ-Gradienten durch die Stabilität des Dimers beeinflusst wird. Diese Vermutung, ebenso wie der Einfluss der DNA-Bindung auf die Gradientenbildung, könnte durch die mathematische Modellierung des Systems unterstützt werden.

Eine noch immer offene Frage ist der Mechanismus der asymmetrischen Zellteilung von *C. crescentus*, die in der Bildung einer längeren Stielzelle und einer kürzeren Schwärmerzelle resultiert<sup>[195]</sup>. Es wurde vorgeschlagen, dass der zunächst in der Zellmitte positionierte Z-Ring aufgrund eines schnelleren Wachstums des Stielzellenkompartiments zum Schwärmerpol verschoben wird<sup>[200]</sup>. Alternativ könnte ein ungleichmäßiger MipZ-Gradient die Grundlage für die asymmetrische Teilung darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings keine Verschiebung des Gradientenminimums von der Zellmitte beobachtet; der Gradient erscheint symmetrisch (**Abbildung 2.27**). Darüber hinaus wurde kein signifikanter Unterschied in der Stärke der polaren Fluoreszenzsignale gemessen, was auf eine ungleichmäßige Verteilung von MipZ-Molekülen hindeuten würde. Dennoch wurde von Schofield et al. mittels einer Software-gestützten Auswertung von Fluoreszenzprofilen eine Asymmetrie des MipZ-Gradienten festgestellt<sup>[183]</sup>. Sein Minimum war um ca. 3 % der Zelllänge zum Schwärmerpol hin verschoben. Zusätzlich wurde in dieser Studie gezeigt, dass die Lokalisation von FtsZ mit der Position des MipZ-Minimums zusammenfiel. Die asymmetrische Lokalisation von FtsZ blieb während der verbleibenden Zeit des Zellzyklus erhalten, so dass die Teilung in unterschiedlich große Tochterzellen auf der Positionierung des Z-Rings ungleich der Zellmitte zu beruhen scheint. Dieses Ergebnis stimmt mit einer elektronenmikroskopischen Untersuchung von *C. crescentus*-Zellen überein<sup>[195]</sup>. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass das Minimum des MipZ-Gradienten tatsächlich zum Schwärmerpol verschoben ist, dies in der vorliegenden Arbeit aus technischen Gründen jedoch nicht aufgelöst werden konnte. Das führt zu der interessanten Frage, welcher Mechanismus die Asymmetrie des MipZ-Gradienten bedingen könnte.

## Der MipZ-Gradient im Vergleich zu anderen regulatorischen Gradienten

In der Entwicklungsbiologie eukaryotischer Vielzeller spielen extrazelluläre Morphogengradienten eine entscheidende Rolle<sup>[65]</sup>. Indem sie konzentrationsabhängig unterschiedliche Antworten in den sie umgebenden Zellen hervorrufen, bestimmen Morphogene die Differenzierung einer Zelle und tragen zur Gewebeentwicklung bei. Um die Bildung von Mustern im Detail zu verstehen, wurden, basierend auf experimentellen Daten, quantitative Modelle für die Gradientenbildung eines Morphogens entwickelt<sup>[211]</sup>. Diese Modelle beinhalten die Diffusion des Morphogens ausgehend von einer lokalisierten Quelle, oft in Verbindung mit seiner Degradation. Darüber hinaus wird die Form des Gradienten durch die Interaktion der Morphogene mit Faktoren, wie z.B. Rezeptoren, Komponenten der extrazellulären Matrix und Inhibitoren beeinflusst<sup>[211]</sup>. Vor kurzem wurde ferner ein mathematisches Modell aufgestellt, wonach in einem wachsenden Gewebe ein Morphogengradient theoretisch ohne Diffusion entstehen kann<sup>[27]</sup>.

Im Gegensatz zu den gut etablierten extrazellulären Morphogengradienten wurden intrazelluläre Gradienten lange Zeit für nicht existent gehalten. Geht man z.B. von einem typischen Diffusionskoeffizienten für ein zytoplasmatisches Protein von  $\sim 10 \mu\text{m}^2/\text{s}$  aus<sup>[38]</sup>, würde in einer Zelle von nur wenigen Mikrometer Länge innerhalb weniger Sekunden ein Konzentrationsausgleich erfolgen.

Tatsächlich aber zeigen verschiedene Studien, dass intrazelluläre Phosphorylierungsgradienten eines Proteins zeitlich stabil sowohl in Eukaryoten als auch Prokaryoten gebildet werden können<sup>[26,152]</sup>. Brown und Khodolenko konnten mittels eines mathematischen Modells zeigen, dass solch ein Phosphorylierungsgradient theoretisch durch die räumliche Trennung der Kinase- und Phosphataseaktivität entstehen kann<sup>[20]</sup>. In Übereinstimmung mit diesem Modell beruht der Phosphorylierungsgradient des Masterregulators CtrA in *C. crescentus* auf räumlich getrennten und unterschiedlichen Aktivitäten der bifunktionellen Kinase/Phosphatase CckA<sup>[26]</sup>. Am gestielten Pol wirkt sie als Phosphatase, während sie am neuen Pol als Kinase aktiv ist und CtrA phosphoryliert. Analog zu Phosphorylierungsgradienten entstehen Gradienten der GTP-gebundenen Form kleiner GTPasen durch die räumliche Trennung des GEFs (*guanosine exchange factor*) und des GAPs (*GTPase activating protein*), welche durch Interaktion mit ihrem G-Protein dieses in die GTP- bzw. GDP-gebundene Form überführen<sup>[93-94,149]</sup>.

Die bisher beschriebenen Gradienten beziehen sich auf Proteinaktivitäten. Mathematische Modellierungen simulierten jedoch, dass zusätzlich zu einem Phosphorylierungsgradienten auch ein intrazellulärer Konzentrationsgradient auftreten kann, wenn die phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Form des Proteins unterschiedliche Diffusionskoeffizienten besitzen<sup>[120]</sup>. Darüber hinaus wird der Gradient in diesem mathematischen Modell durch weitere Parameter beeinflusst, wie die Geschwindigkeit der Kinase- und Phosphatasereaktion. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte schließlich ein Konzentrationsgradient für das *E. coli*-Chemotaxis-System erfolgreich modelliert werden, was darauf hindeutet, dass solche Proteinkonzentrationsgradienten auch im Zytoplasma von Mikroorganismen gebildet werden können<sup>[120]</sup>. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass die Hefe *Schizosaccharomyces pombe* die Homöostase der Zellgröße erhält, indem sie einen polaren Konzentrationsgradienten der Kinase Pom1 zur Koordination des Zellwachstums mit der Zellteilung nutzt<sup>[135,145]</sup>.

Das MipZ System stellt den ersten, experimentell charakterisierten Konzentrationsgradienten in einem prokaryotischen Organismus dar. Auf molekularer Ebene entspricht dieser Gradient einer Ungleichverteilung von MipZ-Dimeren. Analog zu einem eukaryotischen Morphogengradienten werden MipZ-Dimere ausgehend von einer lokalisierten Quelle, dem polaren *parS*/ParB-Komplex,



freigesetzt und diffundieren in Richtung Zellmitte. Die freie Diffusion des Dimers wird dabei, im Gegensatz zu derjenigen des Monomers, durch die Interaktion mit DNA inhibiert, so dass die monomere und dimere Form von MipZ *in vivo* unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten besitzen. Darüber hinaus scheinen die Prozesse der Dimerisierung und des Dimerzerfalls, in Anlehnung an die Trennung der Kinase- und Phosphataseaktivitäten bei einem Phosphorylierungsgradienten, räumlich geteilt zu sein. Die Dimerisierung erfolgt am polaren *parS*/ParB-Komplex, wohingegen das Dimer, induziert durch die ATP-Hydrolyse, zerfällt, während es mit dem Nukleoid assoziiert ist. Das MipZ-System scheint somit sowohl Elemente aus Morphogengradienten als auch aus Aktivitätsgradienten zu nutzen, um ein Konzentrationsgefälle zu generieren, welches der akkuraten Positionierung des Z-Rings dient. Eine bioinformatische Analyse zeigte, dass polare Proteingradienten präziser arbeiten, als räumlich uniforme Modelle<sup>[205]</sup>. Somit scheint das MipZ-System optimal für die Regulation der Zellteilung in *C. crescentus* geeignet.

## 3.2 Räumliche Regulation der Zellteilung: MipZ im Vergleich zum Min-System

In vielen Bakterien wie *E. coli* und seinen nahen Verwandten erfolgt die Positionierung des Z-Rings durch zwei sich gegenseitig ergänzende Mechanismen, das Min-System und *nucleoid occlusion* (NO)<sup>[125]</sup>. In *C. crescentus* dagegen wird dieser Prozess einzig durch die Aktivität von MipZ reguliert. Im Zentrum beider Systeme steht jedoch eine P-loop-ATPase, die die räumliche Information für die Ausbildung des Z-Rings bereitstellt. Sowohl MipZ als auch MinD bilden ATP-abhängig ein Dimer, welches die biologisch aktive Form darstellt<sup>[219]</sup> (**Abbildung 2.5**). MinD polymerisiert, ausgehend von den Polen, entlang der Innenseite der Zytoplasmamembran und rekrutiert gleichzeitig den FtsZ-Inhibitor MinC, so dass die Ausbildung des Z-Rings überall dort inhibiert wird, wo sich MinCD befindet. Eine dritte Komponente, MinE, beschränkt die Aktivität des MinCD-Komplexes auf die polaren Bereiche der Zelle, so dass die Teilung in der Mitte initiiert werden kann. Im Gegensatz zu MinD bildet MipZ keine polymeren Strukturen aus, sondern limitiert die Teilung auf die Zellmitte, indem es einen vom Pol ausgehenden Konzentrationsgradienten an MipZ-Dimeren bildet, welche die Polymerisation von FtsZ inhibieren. Sowohl MipZ als auch MinD sind für diese räumliche Regulation auf ihre ATPase-Aktivität angewiesen. MinD, das nicht mehr von MinE stimuliert wird, liegt gleichmäßig verteilt in der Zelle vor und mit ihm der Inhibitor MinC, so dass die Zellteilung blockiert wird<sup>[74]</sup>. Analog zeigt die hydrolysebeeinträchtigte D42A-Variante von MipZ ein regelmäßiges Lokalisationsmuster *in vivo* und führt zu einem filamentösen Wachstum<sup>[200]</sup> (**Abbildung 2.27**).

Das Min-System verhindert effektiv die Zellteilung an den Polen, erlaubt aber keine Synchronisation dieses Prozesses mit der Chromosomensegregation. Um das zu erreichen, besitzt *E. coli* das NO-System, welches zumindest teilweise durch die Aktivität des SlmA-Proteins vermittelt wird. Durch gleichzeitige Interaktion mit dem Chromosom und FtsZ verhindert es die Teilung der Zelle über nicht segregierten Nukleoiden<sup>[8,203]</sup>. In *C. crescentus* wird die Koordination der Zellteilung mit der Chromosomensegregation, ebenso wie die Positionierung des Z-Rings, von MipZ vermittelt, indem es durch Interaktion mit ParB zu den Replikationsursprüngen (*Cori*) rekrutiert wird. Erst nach erfolgter Initiation der Replikation und Trennung beider *Cori* bildet sich der bipolare MipZ-Gradient aus, der die räumliche Information für die Positionierung des Z-Rings enthält.

Es sei darauf hingewiesen, dass die zelluläre Verteilung von MinD in *E. coli* in der Literatur ebenfalls oft als Gradient bezeichnet wird<sup>[125,129]</sup>. In diesem System ist allerdings die dynamische Lokalisation der beteiligten Proteine entscheidend für die korrekte Positionierung der Teilungsebene (siehe Abschnitt 1.3.1). Ein Konzentrationsgradient ist frühestens in der zeitlich gemittelten Konzentration der MinCD-Proteine erkennbar. MipZ stellt somit das erste Beispiel eines statischen Konzentrationsgradienten in Bakterien dar.

Warum nutzen *E. coli* und *C. crescentus* zwei unterschiedliche Mechanismen, um die Teilungsebene festzulegen? Beide Systeme könnten Anpassungen an ein unterschiedliches Wachstum darstellen. Als Adaptation an ein oligotrophes Habitat ist im Zellzyklus von *C. crescentus* die Zellteilung sehr eng mit der Chromosomenreplikation gekoppelt. Sie erfolgt nur einmal, so dass jede Tochterzelle exakt eine Kopie des Chromosoms erhält<sup>[128]</sup>. Damit besitzen *Caulobacter*-Zellen entweder ein oder zwei Replikationsursprünge, an die MipZ durch Interaktion mit ParB bindet und welche dadurch als Marker für die Chromosomenreplikation und -segregation dienen können. Im Gegensatz dazu initiieren sowohl *E. coli* als auch *B. subtilis* bei schnellem Wachstum eine erneute Replikationsrunde, bevor die vorherige abgeschlossen ist. Als Resultat können Zellen dieser Organismen mehr als zwei Replikationsursprünge enthalten, so dass diese für eine zuverlässige Koordination der DNA-Replikation mit der Zellteilung nicht herangezogen werden können.

Dies erklärt jedoch nur die Untauglichkeit des MipZ-Systems für schnell wachsende Organismen wie *E. coli*. Es bietet jedoch keine Begründung, warum nicht auch *C. crescentus* eine Kombination von Min-System und NO verwendet. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass sich in *C. crescentus* der mediale Z-Ring zu einem Zeitpunkt ausbildet, an dem die Replikation und Segregation der Nukleotide noch nicht abgeschlossen sind, so dass ein NO-System nicht geeignet ist<sup>[85]</sup>. Eine präzise Definition der Teilungsebene erfordert jedoch das Zusammenspiel von Min-System und NO.

Sowohl das Min-System, namentlich MinC, als auch MipZ inhibieren die Assemblierung von FtsZ. MinC ist aus zwei Domänen aufgebaut, die durch einen flexiblen Linker verbunden sind<sup>[30]</sup>. Die C-terminale Domäne (MinC<sup>C</sup>) ist verantwortlich für die Dimerisierung, die Bindung an MinD und, in Anwesenheit von MinD, ebenso für die Bindung an den konservierten C-terminalen Bereich von FtsZ. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass MinC<sup>C</sup> mit FtsA und ZipA um die Bindung an FtsZ konkurriert und dadurch zur Destabilisierung des Z-Rings beiträgt<sup>[188]</sup>. Die N-terminale Domäne von MinC interagiert ebenfalls mit FtsZ-Untereinheiten in einem Filament und inhibiert die Ausbildung des Z-Rings, indem es wahrscheinlich laterale Interaktionen zwischen FtsZ-Filamenten zerstört<sup>[189]</sup>. Ebenso unklar wie der detaillierte Mechanismus der MinC-vermittelten Inhibition von FtsZ ist die Interaktion von MipZ mit FtsZ. MipZ inhibiert die Polymerisation von FtsZ *in vitro* und wandelt lange, gerade FtsZ-Polymere, bestehend aus mehreren lateral assoziierten Protofilamenten, in kurze, gebogene Polymere um<sup>[200]</sup>. Zusätzlich stimuliert MipZ die GTPase-Aktivität von FtsZ um einen Faktor von zwei<sup>[200]</sup> (**Abbildung 2.14**). Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurde vorgeschlagen, dass die Inhibition der FtsZ-Assemblierung durch MipZ sowohl auf strukturellen Änderungen, induziert durch die Bindung von MipZ, als auch auf einer Stimulation der GTP-Hydrolyse beruht<sup>[200]</sup>. Die Primärsequenz von MipZ weist die größten Unterschiede zu anderen P-loop-ATPasen im Bereich des C-Terminus auf, was vermuten lässt, dass strukturelle Elemente in dieser Region von MipZ an der Interaktion mit FtsZ beteiligt sein könnten. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten MipZ-Varianten mit Substitutionen im C-terminalen Bereich waren jedoch nicht in ihrer Wechselwirkung mit FtsZ beeinträchtigt (**Abbildung 2.33**).

Im Gegensatz zu MipZ hat MinC keinen Einfluss auf die GTPase-Aktivität von FtsZ<sup>[75]</sup>, so dass beide Systeme unterschiedliche Mechanismen zu verwenden scheinen, um die Assemblierung des Z-Rings zu inhibieren. Mit Hinblick auf das trotz intensiver Bemühungen lückenhafte Wissen über die MinC-FtsZ-Wechselwirkung ist es deshalb von besonderem Interesse, den Mechanismus der MipZ-FtsZ-Interaktion aufzuklären.

### 3.3 Monocistronisch kodierte ParA-ähnliche Proteine

Neben prototypischen ParA-Proteinen, die an der Segregation von DNA-Molekülen beteiligt sind, kodieren zahlreiche bakterielle Spezies monocistronische, sogenannte *orphan* ParA-ähnliche Proteine, die nicht in einem Operon mit *parB* liegen. Neben MipZ waren ferner einige weitere solcher ATPasen Gegenstand der Forschung. Das zunehmende Wissen über diese Proteine deutet auf ihre Mitwirkung an der räumlichen Organisation diverser zellulärer Prozesse hin.

In dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* sind Carboxysomen, d.h. Kompartimente, in denen die Kohlenstofffixierung stattfindet, regelmäßig entlang der zellulären Längsachse verteilt und werden im Zuge der Zytokinese gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Die Deletion einer ParA-ähnlichen ATPase resultiert in der Auflösung der Carboxysomenorganisation, sowie in ihrer ungleichmäßigen Verteilung auf die Tochterzellen<sup>[180]</sup>. Eine Analyse der Lokalisation des ParA-ähnlichen Proteins zeigte, dass es dynamische, filamentähnliche Strukturen zwischen benachbarten Carboxysomen ausbildet und zwischen den Polen oszilliert. Damit verhält sich dieses Protein wie plasmidkodierte ParA-Proteine, was darüber hinaus vermuten lässt, dass diese ATPase benachbarte Carboxysomen verbindet und regelmäßig in der Zelle verteilt, so dass dadurch eine gleichmäßige Aufteilung dieser Strukturen auf die Tochterzellen gewährleistet ist. Zellen eines *parA*-Deletionsstammes, die nur wenige bzw. keine Carboxysomen nach der Zytokinese enthielten, wiesen darüber hinaus eine reduzierte Fitness auf. Somit könnte ein Segregationssystem, dass die Aufteilung der Carboxysomen reguliert, evolutionär von Vorteil sein<sup>[180]</sup>.

Eine weitere *orphan* ATPase, PpfA, positioniert ein Chemorezeptor-Kluster in *Rhodobacter sphaeroides*<sup>[202]</sup>. Sie vermittelt, abhängig von ihrer ATPase-Aktivität, die gleichmäßige Aufteilung der Komplexe auf die Tochterzellen, indem es diese in den zukünftigen Zellzentren positioniert. Diese Organisation weist eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu der Anordnung von *low copy number*-Plasmiden durch Typ I-Plasmid-Segregationssysteme auf. Eine bioinformatische Analyse des chemotaktischen Apparates zahlreicher Spezies verdeutlichte, dass *ppfA*-Homologe weit verbreitet in *che*-Operons sind und lässt vermuten, dass andere Organismen einen ähnlichen Mechanismus zur Segregation ihrer chemotaktischen Komplexe verwenden könnten wie *R. sphaeroides*<sup>[67]</sup>. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung besitzt *V. cholerae* eine P-loop-ATPase (VC2061), die auf dem großen Chromosom (Chr I) in einem Operon mit Flagellen- und Chemotaxisgenen kodiert ist. Obwohl sie keine signifikante Rolle in der Motilität oder Flagellenbiosynthese spielt<sup>[31]</sup>, könnte sie mit Hinblick auf die Studie an *R. sphaeroides* an der Organisation chemotaktischer Komplexe beteiligt sein.

Ein weiteres Beispiel bietet *Corynebacterium glutamicum*, das weder ein MinCD- noch ein NO-System besitzt. Stattdessen scheint hier, ähnlich wie in *C. crescentus*, ein *orphan* ParA-Protein, PldP genannt, die Positionierung der Teilungsebene zu vermitteln. Eine Deletion von *pldP* führt zur Bildung von Minizellen sowie von verlängerten Zellen, scheint jedoch keinen Einfluss auf die Chromosomensegregation zu haben, welche durch ein konventionelles ParABS-Segregationssystem erfolgt<sup>[40]</sup>.

P-loop-ATPasen mit strukturellen und biochemischen Ähnlichkeiten zum Typ I-DNA-Segregationsprotein ParA scheinen somit die Funktionen dieses Proteins adaptiert zu haben, um nicht nur DNA-Moleküle, sondern auch Proteinkomplexe in der Zelle gezielt zu positionieren. Es ist anzunehmen, dass zukünftige Arbeiten ihre Beteiligung an weiteren molekularen Prozessen zum Vorschein bringen werden.

### 3.4 MipZ-Homologe: Eine neue Unterfamilie der Mrp/MinD-Familie

Die Mrp/MinD-Familie gehört zur Klasse der SIMIBI-GTPasen<sup>[113]</sup>. Proteine dieser Klasse besitzen Ähnlichkeiten sowohl auf der Struktur- als auch Sequenzebene, die sie eindeutig von einer zweiten GTPase Klasse, TRAFAC genannt, abgrenzt. Dazu gehört die parallele Anordnung der zwei  $\beta$ -Stränge, die den Walker B-Strang flankieren. Diese findet sich auch in der Struktur von MipZ wieder (**Abbildung 2.1**). Darüber hinaus besitzen SIMIBI-Proteine, so auch MipZ, drei spezifische Sequenzsynapomorphien. Zum einen ist dies ein konservierter Aspartatrest am Ende des zweiten  $\beta$ -Stranges (D42 in MipZ), zum anderen ein drittes konserviertes Glycin im Walker A-Motiv (G15 in MipZ) und schließlich ein zweiter konservierter Aspartatrest am Beginn des Walker B-Motivs (D105 in MipZ).

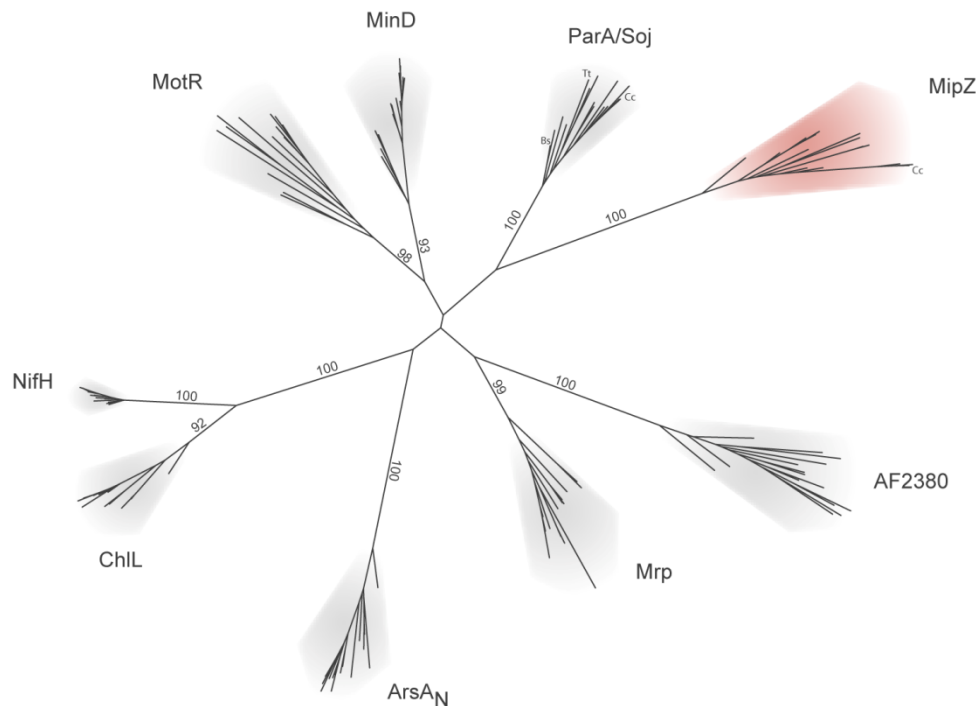
Das Vorhandensein weiterer spezifischer, struktureller Merkmale sowie Sequenzähnlichkeiten erlaubt die Kategorisierung der SIMIBI-Proteine in distinkte Familien<sup>[113]</sup>. Eine dieser Familien ist die Mrp/MinD-Familie, welche unter anderem durch das Vorhandensein eines sogenannten Signaturlysins im N-terminalen Bereich des Walker A-Motivs gekennzeichnet ist. Dieses Lysin ist ebenfalls in der Sequenz von MipZ vorhanden (K13) und kontaktiert, ähnlich wie in NifH-, Soj- und MinD-Dimeren<sup>[114,182,219]</sup>, die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Phosphate des an die zweite Untereinheit gebundenen ATP (**Abbildung 2.2**). Die Konservierung dieses Restes deutet darauf hin, dass alle Mitglieder dieser Familie Dimere bilden. Des Weiteren haben Mrp/MinD-Proteine aufgrund einer Divergenz des [NT]KxD Motivs ihre Spezifität für GTP verloren und binden stattdessen ATP<sup>[113]</sup>. Aufgrund des Zutreffens dieser Merkmale auf MipZ lässt sich diese ATPase eindeutig der Mrp/MinD-Familie zuordnen. Mitglieder dieser Familie sind an diversen zellulären Prozessen beteiligt, wie Chromosomensegregation, Regulation der Zellteilung, Motilität, Stickstofffixierung und dem Export von Oxyanionen.

Entsprechend spezifischer Sequenzunterschiede zwischen ihren Mitgliedern wurde eine weitere Gliederung der Mrp/MinD-Familie in acht Unterfamilien vorgenommen, zu denen NifH, MinD und ParA/Soj gehören<sup>[113]</sup>. Führt man eine BLAST Analyse mit der Aminosäuresequenz von MipZ gegen alle sequenzierten und annotierten mikrobiellen Genome durch, weist ParA mit ca. 30 % Identität die größte Ähnlichkeit mit MipZ auf. Übereinstimmend damit besitzen MipZ- und ParA-Proteine einige Gemeinsamkeiten. Beide bilden ATP-abhängig ein Dimer<sup>[114]</sup> (**Abbildung 2.5**) und zeigen eine geringe, intrinsische ATP-Hydrolyserate<sup>[114,200]</sup> (**Abbildung 2.12**), die essentiell für ihre Funktion ist<sup>[167,187,200]</sup> (**Abbildung 2.27**). Des Weiteren interagieren beide mit dem Chromosomensegregationsprotein ParB<sup>[52,114,184]</sup> (**Abbildung 2.17**). In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass, abgesehen von der ParB-Interaktion, die eben genannten Merkmale auch auf MinD-Proteine zutreffen, die neben ParA eine weitere Unterfamilie der Mrp/MinD-Familie bilden. Vor einigen Jahren wurde vorgeschlagen, ParA und MinD in eine neue Gruppe zytoskelettbildender Proteine zusammenzufassen, WACA (*Walker A cytoskeletal ATPases*) genannt<sup>[138]</sup>. Grundlage dafür waren, neben den zuvor genannten Charakteristika, die

Beobachtungen, dass sowohl MinD- als auch ParA-Proteine ATP-induzierte Polymere auf einer Oberfläche ausbilden und darüber hinaus *in vivo* ein dynamisches Lokalisationsverhalten zeigen. Ein weiteres gemeinsames Merkmal besteht in der Regulation der ATPase-Aktivität und damit der Dynamik von ParA bzw. MinD durch die Interaktion mit einem aktivierenden Protein, ParB bzw. MinE<sup>[138]</sup>.

Es gibt keine Hinweise darauf, dass MipZ polymere Strukturen ausbildet<sup>[200]</sup>, und obwohl es wie ParA mit ParB in Wechselwirkung tritt, wird seine hydrolytische Aktivität durch ParB nicht signifikant stimuliert (**Abbildung 2.13**). Darüber hinaus bilden sowohl ParA als auch MinD eine transkriptionelle Einheit mit ihrem regulatorischen Protein, MipZ ist jedoch in keinem Operon kodiert. Diese Unterschiede zwischen ParA und MinD auf der einen Seite und MipZ auf der anderen deuten, zusammen mit der nur begrenzten Sequenzidentität, darauf hin, dass MipZ-Proteine eine eigene phylogenetische Einheit bilden.

Es ist daher nicht überraschend, dass in einer Homologieanalyse mit den Unterfamilien der Mrp/MinD-Familie sowie MipZ-Homologen, letztere tatsächlich eine selbständige Gruppe bilden, die eindeutig von allen anderen Unterfamilien abgegrenzt ist (**Abbildung 3.2**). Wie bereits durch Leipe et al. festgestellt<sup>[113]</sup>, zeigt der Baum in **Abbildung 3.2** eine nahe Verwandtschaft zwischen MotR-Proteinen und der MinD-Unterfamilie, sowie zwischen NifH- und ChlL-Proteinen, so dass er die phylogenetischen Beziehungen zwischen Mrp/MinD-Proteinen zuverlässig darzustellen scheint. MipZ-Homologe sind am nächsten verwandt zu den ParA/Soj-Proteinen, was durch die zahlreichen strukturellen und biochemischen Gemeinsamkeiten unterstützt wird. Die ParA/Soj-Unterfamilie ist weit verbreitet in Bakterien und Archaea<sup>[113]</sup>. MipZ-Homologe sind dagegen nur in  $\alpha$ -Proteobakterien zu finden, was darauf hindeutet, dass sie, evolutionär betrachtet, eine junge Unterfamilie darstellen, die durch Sequenzdiversifikation aus ParA-Proteinen hervorgegangen ist. Verbunden damit war die Übernahme einer neuen Funktion, die Positionierung des Z-Rings. MipZ stellt somit ein weiteres, doch sicherlich nicht das letzte Beispiel für die funktionelle Diversität der P-loop-ATPasen dar. Andere *orphan* ParA-ähnliche Proteine, wie z.B. PpfA<sup>[202]</sup> bilden möglicherweise weitere Unterfamilien.



**Abbildung 3.2: Phylogenetische Einordnung von MipZ in die Mrp/MinD-Familie von P-loop-ATPasen.** Proteinsequenzen von 15 Vertretern jeder Unterfamilie (siehe Appendix A.2) wurden für die Erstellung eines *Alignments* mittels MAFFT v6<sup>[96]</sup> herangezogen. Die phylogenetische Analyse erfolgte mittels der *Maximum Likelihood* (ML)-Methode unter Zuhilfenahme des RaxML-Programms<sup>[190]</sup> und einer anschließenden Darstellung des Baums mit Hilfe von iTOL<sup>[116]</sup>. Die Zahlen stellen Bootstrap-Werte zur statistischen Unterstützung der Knoten dar. Eine Analyse mittels der *Neighbor Joining* (NJ)-Methode unterstützt den hier dargestellten Baum. Für die phylogenetische Analyse wurde die N-terminale ATPase-Domäne der ArsA-Proteine verwendet. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit der C-terminalen Domäne erhalten (Daten nicht gezeigt).

### 3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Biologische Systeme, sei es auf zellulärer oder einer höher geordneten Ebene, zeichnen sich durch eine erstaunliche Komplexität aus. Diese beruht unter anderem auf der räumlichen Heterogenität regulatorischer Schlüsselkomponenten. Das wohl am besten untersuchte Beispiel stellen extrazelluläre Morphogene dar, die in multizellulären Organismen durch Ausbildung eines auf Diffusion basierenden Konzentrationsgradienten zahlreiche Entwicklungsprozesse regulieren. Dieses Muster setzt sich in Eukaryoten auf der zellulären Ebene fort, wo Konzentrations- und Phosphorylierungsgradienten sowie Ran-GTP-Gradienten an der Homöostase der Zellgröße, der Regulation der Chromosomensegregation, der Zellteilung, der Adhäsion und der Zellmigration beteiligt sind. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass solche Gradienten in prokaryotischen Organismen aufgrund ihrer geringen Größe nicht aufrecht erhalten werden können. Heutzutage ist jedoch bekannt, dass diffusionsbasierte Phosphorylierungsgradienten in Bakterien sowohl an der räumlichen Organisation der Zelle als auch an der Etablierung einer Asymmetrie beteiligt sind. Die Existenz eines statischen Konzentrationsgradienten in Bakterien wurde durch die Entdeckung und funktionelle Charakterisierung des MipZ-Proteins gezeigt. Diese *orphan* P-loop-ATPase bildet in dem  $\alpha$ -Proteobakterium *C. crescentus* einen bipolaren Gradienten aus, welcher die Positionierung der Teilungsebene kontrolliert. MipZ interagiert mit dem *parS*/ParB-Nukleoproteinkomplex in der Nähe des chromosomalen Replikationsursprungs. Nach Eintritt in die S-Phase werden die replizierten Ursprünge getrennt und an den beiden Zellpolen verankert. Als Resultat bildet MipZ

einen Konzentrationsgradienten aus, dessen Maxima in den polaren Bereichen liegen und dessen Minimum sich in der Zellmitte befindet. Da MipZ ein Inhibitor der Z-Ring-Assemblierung ist, beschränkt es auf diese Weise die Positionierung der Teilungsebene auf die Mitte der Zelle.

In der vorliegenden Arbeit wurde der dem Konzentrationsgradienten von MipZ zugrundeliegende Mechanismus charakterisiert. Unter Zuhilfenahme von Substitutionsvarianten, die den ATPase-Zyklus von MipZ auf der Ebene der Nukleotidbindung, der ATP-abhängigen Dimerisierung oder der ATP-Hydrolyse unterbrechen, konnte gezeigt werden, dass die Grundlage des Gradienten ein durch die ATPase-Aktivität kontrollierter Wechsel zwischen einer monomeren und einer dimeren Form ist, welche unterschiedliche Interaktionsnetzwerke und als Folge dessen abweichende Mobilitäten *in vivo* zeigen. Monomeres MipZ interagiert mit ParB und wird dadurch zu den Polen rekrutiert, wohingegen dimeres MipZ die biologisch aktive Form darstellt, die mit FtsZ interagiert. Darüber hinaus bindet das MipZ-Dimer an das Nukleoid, wodurch es in seiner Beweglichkeit gegenüber dem Monomer eingeschränkt wird. Da MipZ-Monomere durch die Interaktion mit ParB in den polaren Bereichen konzentriert werden, erfolgt die Dimerisierung mit großer Wahrscheinlichkeit am Pol. Von dort ausgehend diffundieren Dimere, verlangsamt durch ihre Assoziation mit der DNA, in Richtung Zellmitte, so dass der Gradient als eine asymmetrische Verteilung von MipZ-Dimeren betrachtet werden kann. Eine mathematische Modellierung des Systems auf Grundlage der experimentellen Daten könnte dieses Modell unterstützen. Ferner ist eine nähere Betrachtung der MipZ-FtsZ-Interaktion von besonderem Interesse, vor allem mit Hinblick auf die ebenfalls nur ungenügend verstandene Interaktion von FtsZ mit MinC, welches der Inhibitor der polaren Z-Ring-Assemblierung in *E. coli* und *B. subtilis* ist.

Ein Sequenzvergleich mit weiteren P-loop-ATPasen zeigte, dass sich MipZ in die Mrp/MinD-Familie von P-loop-ATPasen einordnen lässt. Mitglieder dieser Familie sind an der Regulierung diverser zellulärer Abläufe beteiligt, wie z. B. Stickstofffixierung, Chromosomensegregation und Zellteilung. Eine eingehende phylogenetische Analyse von MipZ-Homologen veranschaulichte, dass diese eine distinkte, bisher nicht definierte Unterfamilie der Mrp/MinD-Proteine bilden, die am nächsten mit den in der Chromosomensegregation involvierten ParA/Soj-Proteinen verwandt ist. Mikrobielle Genome kodieren zahlreiche weitere *orphan* P-loop-ATPasen und es bleibt abzuwarten, wo sich diese einordnen lassen und welche Funktionen sie übernehmen.





## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden analysenrein von den Firmen Becton Dickinson (USA), Biotec (Deutschland), Carl Roth (Deutschland), Difco (Spanien), GE Healthcare (Deutschland), Jena Bioscience (Deutschland), Merck (Deutschland), Peqlab (Deutschland), Perbio Science (Deutschland), Perkin Elmer (Deutschland), Qiagen (Deutschland) und Sigma-Aldrich (Deutschland) bezogen.

Die Radiochemikalien [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-ATP und [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-GTP (je 3000 Ci/mmol) wurden bei Hartmann Analytic (Deutschland) bestellt. Restriktions- und DNA-modifizierende Enzyme wurden über New England Biolabs (Deutschland) oder Fermentas (Kanada) bezogen.

Spezielle Chemikalien und Enzyme werden im Text behandelt.

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Ausubel<sup>[5]</sup> und Sambrook<sup>[179]</sup> hergestellt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen in Reinstwasser angesetzt und in der Regel autoklaviert (20 min, 121 °C) bzw. sterilfiltriert (Filter der Firma Sarstedt, Deutschland; Porengröße 0,22 oder 0,45  $\mu$ m). Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den einzelnen Methoden aufgeführt.

#### 4.1.3 Medien

Alle Komplexmedien wurden für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Medienzusätze wie Antibiotika, Aminosäuren und Zucker wurden mit Filtern (Porengröße 0,22  $\mu$ m) der Firma Sarstedt (Deutschland) sterilfiltriert und den Medien erst nach Abkühlung auf 60 °C zugesetzt.

Minimalmedien wurden ebenfalls sterilfiltriert.

<b>LB</b>	<i>(lysogeny broth, Miller)</i> Medium	1,0 % (w/v)	Trypton
		0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
		1,0 % (w/v)	NaCl
<b>PYE</b>	<i>(peptone yeast extract)</i> Medium	0,2 % (w/v)	Bacto <sup>TM</sup> Pepton
		0,1 % (w/v)	Hefeextrakt
		1 mM	MgSO <sub>4</sub>
		0,5 mM	CaCl <sub>2</sub>

<b>M2G</b> (M2-Minimalmedium mit Zusatz von Glukose)	6,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3,9 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM	NH <sub>4</sub> Cl
	0,5 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,2 % (w/v)	Glukose
	0,1 % (v/v)	FeSO <sub>4</sub> /EDTA-Lsg. (Sigma-Aldrich, Deutschland)
<b>M2G<sub>N</sub></b> -Minimalmedium	6,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3,9 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM	NaNO <sub>3</sub>
	0,5 mM	MgSO <sub>4</sub>
	0,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,2 % (w/v)	Glukose
	0,1 % (v/v)	FeSO <sub>4</sub> /EDTA-Lsg. (Sigma-Aldrich, Deutschland)

Den entsprechenden Festmedien wurde 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

<b>YPAD</b> (Vollmedium)	2 % (w/v)	Bacto™Pepton
	1 % (w/v)	Hefeextrakt
	2 % (v/v)	50 % Glucose
	0,003 % (v/v)	0,2 % Adeninhemisulfat
<b>SD</b> (Minimalmedium)	0,67 % (w/v)	Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren
	1 x	10x AS- <i>Dropout</i> -Mix
	0,002 % (v/v)	0,2 % (w/v) Histidin
	0,01 % (v/v)	0,2 % (w/v) Tryptophan
	0,01 % (v/v)	0,2 % (w/v) Leucin
10 x AS- <i>Dropout</i> -Mix:	0,02 % (w/v)	L-Adenin Hemisulfat
	0,02 % (w/v)	L-Arginin·HCl
	0,03 % (w/v)	L-Isoleucin
	0,03 % (w/v)	L-Lysin·HCl
	0,02 % (w/v)	L-Methionin
	0,05 % (w/v)	L-Phenylalanin
	0,2 % (w/v)	L-Threonin
	0,03 % (w/v)	L-Tyrosin
	0,15 % (w/v)	L-Valin

Den entsprechenden Festmedien wurde 2 % (w/v) Agar zugegeben.

### Medienzusätze

In **Tabelle 4.1** sind alle verwendeten Antibiotika sowie die jeweiligen Arbeitskonzentrationen aufgelistet. **Tabelle 4.2** listet die verwendeten Kohlenhydratlösungen auf. Als weitere Medienzusätze wurden 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, 60 mM) in einer Endkonzentration von 300 µM und Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG, 1 M) in einer Endkonzentration von 0,5 mM verwendet.

**Tabelle 4.1** Eingesetzte Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	Stammkonzentration (mg/ml)	Arbeitskonzentration (µg/ml)			
		<i>E. coli</i> (flüssig)	<i>E. coli</i> (fest)	<i>C. crescentus</i> (flüssig)	<i>C. crescentus</i> (fest)
Ampicillin	100	200	200	-	-
Cephalexin	5	5	-	-	-
Chloramphenicol (in 70 % EtOH)	10	20	30	-	-
Gentamycin	1	-	-	0,5	5
Kanamycin	50	50	50	5	25
Spectinomycin	20	-	-	25	50
Streptomycin	10	-	-	-	5

**Tabelle 4.2** Eingesetzte Kohlenhydratlösungen

Kohlenhydrat	Stammkonzentration % (w/v)	Arbeitskonzentration (%)		
		<i>E. coli</i> (flüssig)	<i>E. coli</i> (fest)	<i>C. crescentus</i> (flüssig)
L-Arabinose	20	0,1	-	-
D(+)-Glucose	20	0,2	0,2	-
myo-Inositol	10	-	-	0,3
D(+)-Maltose	20	-	1,0	-
D(+)-Xylose	20	-	-	0,3

#### 4.1.4 Oligonukleotide und Plasmide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe von GeneTool Lite 1.0 (BioTools Inc., Kanada) erstellt und von den Firmen Sigma (Deutschland) bzw. Eurofins MWG Operon (Deutschland) bezogen.

Plasmide wurden ebenfalls mit GeneTool Lite 1.0 konstruiert. Eine Liste aller Oligonukleotide und Plasmide befindet sich im Anhang.

#### 4.1.5 Stämme

Der in dieser Arbeit verwendete Wildtyp-Stamm ist *Caulobacter crescentus* CB15N (NA1000)<sup>[50]</sup>. Die Hefe-Ein-Hybrid-Analyse wurde mit *Saccharomyces cerevisiae* AH109<sup>[84]</sup> durchgeführt.

Zur Klonierung, Proteinproduktion und das bakterielle Zwei-Hybrid-System wurden die in **Tabelle 4.3** aufgeführten *Escherichia coli*-Stämme genutzt. Alle weiteren Stämme sind im Anhang in **Tabelle A.3** aufgelistet.

**Tabelle 4.3** Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara</i> <i>len</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
Rosetta <sup>TM</sup> 2(DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub></i> - <i>m<sub>B</sub></i> -) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pLysSpRARE2 (Cam <sup>R</sup> )	Novagen
BTH101	F <sup>-</sup> <i>cya-99</i> <i>araD139</i> <i>galE15</i> <i>galK16</i> <i>rpsL1</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>hsdR2</i> <i>mcrA1</i> <i>mcrB1</i>	Euromedex

## 4.2 Mikrobiologische und zellbiologische Methoden

### 4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme wurden unter Standardbedingungen in flüssigem LB-Medium, supplementiert mit den jeweiligen Antibiotika, bei 37 °C und 210 rpm in einem Schüttelinkubator gezogen. Zum Wachstum auf LB-Agarplatten wurden die Bakterien auf dieser ausgestrichen und über Nacht bei ebenfalls 37 °C inkubiert.

Zur heterologen Proteinproduktion wurde der Stamm Rosetta<sup>TM</sup>2(DE3)pLysS mit dem entsprechenden Überexpressionsplasmid transformiert. 750 ml LB-Medium wurden mit 1/10 Volumen einer Übernachtskultur beimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Die Expression des plasmidkodierten Gens wurde bei einer optischen Dichte (OD<sub>600nm</sub>) von 0,7-1,0 durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid) Endkonzentration induziert. Zum Test auf Protein-Protein-Interaktion wurde der mit den komplementären Zwei-Hybrid-Plasmiden transformierte Stamm BTH101 auf MacConkey-Agarplatten, supplementiert mit 1 % Maltose, ausgestrichen und für 24 h bei 30 °C gezogen.

### 4.2.2 Kultivierung von *C. crescentus*

Alle in dieser Arbeit verwendeten *Caulobacter*-Stämme sind vom synchronisierbaren Wildtyp-Stamm CB15N (NA1000) abgeleitet<sup>[50]</sup>. Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C in PYE-Vollmedium bzw. M2G<sup>[47]</sup>- oder M2G<sub>N</sub><sup>[200]</sup>-Minimalmedium.

### 4.2.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Anzucht des Hefestammes AH109 erfolgte bei 30 °C in YPAD-Medium (Vollmedium), da dieser aufgrund genomischer Mutationen für die Aminosäuren Tryptophan und Leucin auxotroph ist. Zellen, die mit den komplementären Zwei-Hybrid-Plasmiden transformiert worden waren, wurden dagegen in SD/-Trp/-Leu-Minimalmedium kultiviert.

### 4.2.4 Lagerung der Stämme

Für die Langzeitlagerung von Stämmen wurden Suspensionskulturen mit 1/10 Volumen Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und bei -80 °C gelagert.

### 4.2.5 Hefe-Ein-Hybrid-Analyse

Der verwendete  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstest dient dem Nachweis der Expression des *lacZ*-Gens in *S. cerevisiae* und somit auch der DNA-bindenden Fähigkeit der MipZ-Proteine. Zellen, die die komplementären Zwei-Hybrid-Plasmide trugen, wurden über Nacht in SD-Medium angezogen. Nach Resuspension der Zellaggregate wurde 1 ml der Übernachtskultur in 5 ml YPD (YPAD ohne Adeninhemisulfat) verdünnt und bei 30 °C im Schüttelinkubator (210-230 rpm) bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600nm}$ ) von 0,5-0,8 angezogen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 1 min bei 14000 rpm pelletiert, in 1 ml Z-Puffer (60 mM  $Na_2HPO_4$ , 40 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $MgSO_4$ , pH 7,0) gewaschen und schließlich in 0,1 ml Z-Puffer aufgenommen. Nach Aufbruch der Zellen durch drei Frier-Tau-Zyklen in flüssigem Stickstoff erfolgte die Zugabe von 0,7 ml Z-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (0,27 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol auf 100 ml Z-Puffer). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 160  $\mu$ l frisch hergestellter ONPG (o-Nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranosid)-Lösung (4 mg/ml in Z-Puffer) gestartet und erfolgte bei 30 °C, bis eine gelbe Färbung sichtbar wurde. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 400  $\mu$ l 1 M  $Na_2CO_3$  gestoppt und die Zeit notiert. Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min sedimentiert, um anschließend die Absorption des klaren Überstands bei 420 nm zu messen. Die enzymatische Aktivität in Miller Units wurde mit Hilfe folgender Gleichung bestimmt, wobei  $t$  die Inkubationszeit in Minuten und  $V$  das eingesetzte Kulturvolumen ist:

$$MU = \frac{1000 \times A_{420}}{t \times V \times OD_{600}}$$

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 Konstruktion der Plasmide

Plasmide wurden mit Hilfe von GeneTool Lite 1.0 (BioTools Inc., Kanada) konstruiert und sind im Anhang in **Tabelle A.2** aufgelistet. Für die Klonierung wurde *E. coli* TOP10 verwendet. Alle generierten Plasmide wurden zunächst mittels Kolonie-PCR auf Vorhandensein des Inserts getestet und anschließend sequenziert.

#### Plasmide für die Expression von Fluoreszenzfusionen:

Für die Konstruktion von pDK4 wurde pMT151 mit Hilfe der Oligonukleotide CC2165-K13A-QCM1 und CC2165-K13A-QCM2 mutagenisiert, mit den Restriktionsendonukleasen NdeI/SacI geschnitten und das so isolierte *mipZ*<sub>K13A</sub>-Gen in den entsprechend behandelten Vektor pMT151 ligiert.

Die Plasmide pDK2, pDK3 und pDK7-9 wurden konstruiert, indem die entsprechende *mipZ-yfp* Fusion aus den Plasmiden pMT151, pMT362, pDK4, pMT174 bzw. pMT209 mittels Restriktion mit XhoI, anschließender Glättung der Enden durch Behandlung mit T4-Polymerase und Restriktion mit NdeI isoliert wurde. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit pBAD24-CB ligiert, der zuvor mit HindIII geschnitten, mit T4-Polymerase behandelt und dann mit NdeI geschnitten worden war.

**Plasmide für die Proteinaufreinigung:**

Für die Konstruktion der Plasmide pDK6, pDK10, pDK12 und pDK13 wurde das entsprechende *mipZ*-Allel mit Hilfe der Plasmide pSW12, pDK4, pSW10 bzw. pSW11 und den Oligonukleotiden Pxy1-1 und CC2165-revHindIII über PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit den Enzymen NdeI und HindIII geschnitten und anschließend in den auf gleiche Weise behandelten Vektor pET21a(+) ligiert.

**Plasmide für die Hefe-Ein-Hybrid-Analyse:**

Die Plasmide pDK14, pDK22, pDK23, pDK24 und pDK25 wurden generiert, indem das entsprechende *mipZ*-Gen aus genomischer DNA bzw. den Plasmiden pDK3, pDK8, pDK9 und pDK7 mit den Oligonukleotiden CC2165-uni2 und CC2165-rev amplifiziert wurde. Die PCR-Produkte wurden mit den Enzymen NdeI und EcoRI geschnitten und anschließend in den auf gleiche Weise behandelten Vektor pGADT7 ligiert.

**Plasmide für das bakterielle Zwei-Hybrid-System:**

Für die Konstruktion des Plasmids pDK34 wurde das *mipZ*-Gen aus dem Plasmid pMT183 mit Hilfe der Oligonukleotide *mipZ*-BACTH-for und *mipZ*-KT25-rev über PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten und anschließend in das auf gleiche Weise behandelte Plasmid pKT25 ligiert.

Die Plasmide pDK35 und pDK36 wurden konstruiert, indem das *mipZ*-Gen aus pMT183 mit Hilfe der Oligonukleotide *mipZ*-BACTH-for und *mipZ*-KNT25-rev amplifiziert wurde. Das resultierende DNA-Fragment wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten und in die ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Plasmide pKNT25 bzw. pUT18 ligiert.

Um pDK37 zu erhalten, wurde das *mipZ*-Gen aus pMT183 mit den Oligonukleotiden *mipZ*-BACTH-for und *mipZ*-UT18C-rev amplifiziert, anschließend mit BamHI und EcoRI geschnitten und schließlich in den Vektor pUT18C ligiert, der zuvor ebenfalls mit dieser Enzymkombination behandelt worden war.

**Plasmide für die Produktion von Hexahistidin-markierten Proteinen in *C. crescentus***

Für die Konstruktion der integrierenden Plasmide pDK80, pDK81 und pDK82 wurde das entsprechende *mipZ*-Allel mit Hilfe der Plasmide pMT183, pMT415 bzw. pMT413 und den Oligonukleotiden CC2165-uni2 und *his6*-rev über PCR amplifiziert. Das DNA-Fragment wurde mit NdeI und SacI geschnitten und in den ebenfalls so geschnittenen Vektor pMT151 ligiert.

**4.3.2 DNA-Präparation und –Sequenzierung**

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe der GenElute™ HP Plasmid Miniprep und Maxiprep Kits (Sigma-Aldrich, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde mittels eines Nanodrop ND-1000 Spektralphotometers (Nanodrop, USA) bestimmt bzw. überprüft.

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde diese in einer Konzentration von 50-100 ng/μl unter Angabe der zu verwendenden Oligonukleotide an die Firma Eurofins MWG Operon (Deutschland) gesendet. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mittels GeneTool Lite 1.0 ausgewertet.

### 4.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR wurde die KOD Hot Start Polymerase (Merck, Deutschland) zusammen mit weiteren vom Hersteller bereitgestellten Lösungen, 1 mM MgSO<sub>4</sub> und 5 % DMSO verwendet. Als Matrize wurde chromosomale bzw. Plasmid-DNA verwendet. Oligonukleotide (siehe Anhang **Tabelle A.1**) wurden in einer Endkonzentration von 0,5 µM eingesetzt. **Tabelle 4.4** fasst das verwendete PCR-Programm zusammen.

**Tabelle 4.4** Standard-PCR-Programm für KOD-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	45 s	30 Zyklen
Anlagerung der Oligonukleotide	65 °C	45 s	
Elongation	72 °C	30 s pro kb	
Finale Elongation	72 °C	4 min	

PCR-Fragmente wurden direkt mit Hilfe des GeneElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma, Deutschland) oder mittels eines präparativen Agarosegels und des GeneElute™ Gel Extraction Kit (Sigma, Deutschland) aufgereinigt.

Zur Kontrolle der Aufnahme eines Plasmids in die Zelle bzw. der korrekten genomischen Integration eines DNA-Fragmentes wurde eine sogenannte Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde ein fertiger Mix (BioMix™ Red, Boline, Deutschland) verwendet, der abgesehen von der Matrize, den spezifischen Oligonukleotiden und DMSO bereits alle für die PCR benötigten Komponenten enthält. Der Mix wurde in einer Verdünnung von 1:2 eingesetzt und mit spezifischen Oligonukleotiden in einer Endkonzentration von 0,5 µM und DMSO zu 5 % versetzt. Als Matrize dienten ganze Zellen, die mit dem fertigen Ansatz gemischt wurden. **Tabelle 4.5** zeigt das für die Kolonie-PCR verwendete Programm.

**Tabelle 4.5** Standard-PCR-Programm für eine Kolonie-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	4 min	
Denaturierung	95 °C	45 s	25 Zyklen
Anlagerung der Oligonukleotide	65 °C	45 s	
Elongation	72 °C	60 s pro kb	
Finale Elongation	72 °C	4 min	

#### 4.3.4 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Restriktion wurden ca. 5 µg DNA mit den entsprechenden Endonukleasen (NEB, Deutschland; Fermentas, Kanada) gemischt und für 1-12 h bei 37 °C inkubiert. Die jeweilige Enzymmenge, der einzusetzende Puffer sowie der Zusatz von 0,1 mg/ml BSA wurden nach Herstellerangaben gewählt. Die 5'-Enden linearisierter Plasmid-DNA wurden mittels SAP (*shrimp alkaline phosphatase*, Fermentas, Kanada) dephosphoryliert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente über ein präparatives Agarosegel und GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma, Deutschland) oder direkt über den GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma, Deutschland) aufgereinigt.

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase zusammen mit einem *Rapid Ligation Buffer* nach den Angaben des Herstellers (Fermentas, Kanada) verwendet. Die optimalen Vektor/Insert-Verhältnisse für eine erfolgreiche Ligation wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Insert}(ng) = \frac{\text{Vektor}(ng) \times \text{Größe Insert}(kb)}{\text{Größe Vektor}(kb)} \times \text{molares Verhältnis (Insert|Vektor)}$$

#### 4.3.5 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel in 0,5-fach TAE-Puffer (20 mM Tris Base, 0,175 % Essigsäure, 0,5 mM EDTA) nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Visualisierung der DNA wurde den Gelen Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,005 % zugefügt. Vor dem Auftragen der Probe auf das Gel wurde diese mit einem  $\frac{1}{10}$  Volumen 10-fach DNA-Probenpuffer (50 % Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau, 0,2 % Xylencyanol, 0,2 M EDTA) versetzt. Die Analyse der Elektrophorese erfolgte in einem UV-Transilluminator (UVP-BioDoc-IT™ Imaging System, UniEquip, Deutschland).

#### 4.3.6 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde das Protokoll von Sambrook<sup>[179]</sup> in modifizierter Form verwendet.

250 ml LB-Medium wurden 1:100 mit einer Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C und 210 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer optische Dichte ( $OD_{600nm}$ ) von 0,6 angezogen. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, in 15 ml eiskaltem 0,1 M  $CaCl_2$  resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut sedimentiert, in 4 ml eiskaltem 0,1 M  $CaCl_2$  mit 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 150 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Für die Transformation wurden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 20 µl Ligationsansatz bzw. 50-100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem „Hitzeschock“ für 2 min bei 42 °C wurden die Zellen erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 800 µl LB-Medium zur Zellsuspension gegeben und die Zellen für 60 min schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Von dem Transformationsansatz wurde im Fall von Plasmid-DNA  $\frac{1}{10}$  Volumen und im Fall der Transformation einer Ligation der gesamte Ansatz auf LB-Agarplatten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert waren, ausplattiert. Nach



Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden Einzelklone auf frische LB-Agarplatten überführt und mittels Kolonie-PCR die Aufnahme der DNA überprüft.

#### 4.3.7 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation des Hefestammes AH109 erfolgte nach einem *Rapid Transformation Protocol* [60]. AH109-Zellen von einer nicht mehr als 2 Tage alten YPAD-Agarplatte wurden in 1 ml sterilem Reinstwasser aufgenommen, durch Vortexen resuspendiert und anschließend sedimentiert (30 s, 14000 rpm, Tischzentrifuge). Alternativ wurden 2 ml bzw. 5 ml einer Übernachtskultur in YPAD- bzw. SD-Medium sedimentiert und mit 1 ml Reinstwasser gewaschen. Zu den Zellen wurden sukzessiv folgende Komponenten des Transformations-Mix gegeben und das Pellet durch Vortexen resuspendiert:

Transformations-Mix:	240 µl	50 % (w/v) PEG4000
	36 µl	1 M Lithiumacetat
	10 µl	11 mg/ml <i>carrier</i> -DNA
	40 µl	Reinstwasser
	34 µl	Plasmid-DNA (0,1-1 µg)

Die *carrier*-DNA (Herings Sperma, Sigma-Aldrich, Deutschland) wurde vor der Zugabe zum Transformations-Mix für 5 min gekocht und anschließend gevortext.

Sobald alle Komponenten des Transformations-Mix zu den Zellen gegeben wurden, erfolgte eine 45-minütige Inkubation bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben sedimentiert, nach Entfernen des Transformations-Mix in 200 µl Reinstwasser aufgenommen und auf einer entsprechenden SD-Agarplatte ausgestrichen. Die Anzucht erfolgte für 2 bis 3 Tage bei 30 °C.

#### 4.3.8 Herstellung und Transformation elektrokompeter *C. crescentus*

Zur Herstellung elektrokompeter *C. crescentus*-Zellen wurden diese in 2-fach konzentriertem PYE-Medium bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 1,0 angezogen. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert und zweimal mit dem gleichen Volumen eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin gewaschen. Für einen dritten Waschschrift wurden die Zellen in 1/10 Volumen 10 % Glycerin aufgenommen, sedimentiert und schließlich in 1/50 des Ausgangsvolumens resuspendiert. Die Zellen wurden in 80 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Elektroporation mit Plasmiden, die einfach homolog in das Genom integrieren sollten, wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 0,5-1 µg der Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wurde in eine sterile Elektroporationsküvette überführt, bei 1,5 kV und 400 Ω, 25 µF elektroporiert und anschließend sofort mit 900 µl eiskaltem 2-fach PYE-Medium vermischt. Nach Inkubation für 1-3 h bei 28 °C wurden je 250 µl der Zellsuspension auf einer PYE-Agarplatte mit dem zur Selektion nötigen Antibiotikum ausplattiert und für 2-3 Tage bei 28 °C inkubiert. Die Aufnahme der DNA wurde mittels Kolonie-PCR überprüft.

#### 4.3.9 Transduktion von *C. crescentus*

Die Transduktion wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt<sup>[47]</sup>. Zunächst wurde ein Phagenlysats des Stammes hergestellt, dessen DNA in den Rezipientenstamm übertragen werden sollte. Hierfür wurden 500 µl Übernachtskultur mit 2 µl einer Präparation von  $\Phi$ Cr30 (>1000 PFU/µl) gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 5 ml PYE-Softagar (PYE + 0,3 % Agar + 0,2 % (v/v) Glukose) gemischt und anschließend auf einer PYE-Agarplatte verteilt und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Der Softagar wurde mit 6 ml PYE-Medium von der Platte gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Mischung wurde am darauffolgenden Tag mit 100 µl Chloroform versetzt und für 10 s gevortext. Agar und Zellrückstände wurden bei Raumtemperatur und 4700 rpm für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und erneut mit 100 µl Chloroform versetzt und für 10 min gevortext. Das so präparierte Phagenlysats war bei 4 °C für 2 Jahre haltbar.

Ein Volumen von 500 µl des so gewonnen Phagenlysats wurden für die Transduktion im UV-Crosslinker mit 120 mJ/cm<sup>2</sup> inaktiviert (bei Lagerung bei 4 °C ca. 3 Monate verwendbar). Für die eigentliche Transduktion des Rezipientenstammes wurde dieser über Nacht angezogen. 250 µl Kultur wurden anschließend mit 1/10 Volumen des inaktivierten Phagenlysats gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden auf Festmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 28 °C angezogen.

### 4.4 Biochemische Methoden

#### 4.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Kontrolle der heterologen Überproduktion von Proteinen, der Analyse der Fraktionen während der Proteinaufreinigung und als Ausgangspunkt für eine Western Blot-Analyse wurde die SDS-PAGE nach Lämmli<sup>[103]</sup> durchgeführt. Proteingemische wurden dazu über 5 %-ige Sammel- und 11 %-ige Trenngele (Zusammensetzung siehe **Tabelle 4.6**) in einem Tris/Glycin-Puffer (25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) bei 15-30 mA pro Gel denaturierend aufgetrennt. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit 5-fach SDS-Probenpuffer (300 mM Tris Base, 50 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 500 mM Dithiothreitol, 0,05 % Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt, für 10 min bei 95 °C inkubiert und anschließend zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas, Kanada) auf das Gel aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde das PerfectBlue™ Doppelsystem Twin S von Peqlab (USA) verwendet.

**Tabelle 4.6:** Zusammensetzung eines 5 %-igen Sammel- und eines 11 %-igen Trenngels

Komponente	5 % Sammelgel (2,5 ml)	11 % Trenngel (5 ml)
Reinstwasser	1,43 ml	1,9 ml
500 mM Tris Base (pH 6,8) 0,4 % (w/v) SDS	625 µl	-
1,5 M Tris Base (pH 8,8) 0,4 % (w/v) SDS	-	1,25 ml
30 % Rotiphorese® NR-Acrylamid/Bis-Lösung (29:1)	417 µl	1,9 ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	1,9 ml	3 µl
10 % (w/v) APS (Ammoniumperoxodisulfat)	25 µl	40 µl

Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Detektion der Proteine entweder für mindestens 45 min schwenkend in Coomassie-Lösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % (w/v) Brilliant Blue R 250) gefärbt und anschließend entfärbt (20 % Ethanol, 10 % Essigsäure) oder es wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt.

#### 4.4.2 Western Blot

Für die Immunblot-Analyse wurden Flüssigkulturen sedimentiert und die Zellen entsprechend der OD<sub>600nm</sub> und des pelletierten Kulturvolumens in 1-fach SDS-Probenpuffer aufgenommen (1 ml einer Kultur OD<sub>600nm</sub> = 1 wurde in 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen). Die Proben wurden für 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt. Für den Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Millipore, USA) wurde diese zunächst für 15 s in Methanol inkubiert, für 2 min in Reinstwasser gewaschen und für mindestens 5 min in Western Transferpuffer (25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 10 % Methanol) äquilibriert. Der Transfer erfolgte mit einem PerfectBlue™ Semi-Dry-Elektroblotter (Pierce, USA) bei 2 mA pro cm<sup>2</sup> für 1,5-2 h. Unspezifische Bindungen wurden anschließend durch Inkubation der Membran bei 4 °C über Nacht oder für 1-2 h in 5 % Milchpulver in TBST (10 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Tween20, pH 7,5) geblockt. Die Markierung der MipZ-Proteine erfolgte mit einem spezifischen Antikörper (α-CC2165<sub>A</sub>, 1:10000) in 5 % Magermilch in TBST bei Raumtemperatur für 2 h. Anschließend wurde die Membran dreimal in TBST gewaschen. Als Sekundäntikörper wurde ein HRP (*horseradish peroxidase*)-konjugierter Antikörper gegen Kaninchen-IgG (goat anti-rabbit; Perkin Elmer, USA) in einer Verdünnung von 1:20000 in 5 % Magermilch in TBST eingesetzt. Nach 2-stündiger Inkubation mit diesem Antikörper wurde die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Lösung (Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus; Perkin Elmer, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die Signale wurden anschließend durch Belichten eines Amersham Hyperfilm™ ECL-Chemilumineszenzfilms (GE Healthcare, Deutschland) sichtbar gemacht.

#### 4.4.3 Heterologe Überexpression in *E. coli*

Zur Proteinproduktion wurde der Stamm Rosetta™2(DE3)pLysS mit dem entsprechenden Überexpressionsplasmid transformiert. Alle MipZ-Proteine wurden mit einem Hexahistidin-Affinitätsmarker, fusioniert an den C-Terminus des Proteins, produziert. ParB und FtsZ dagegen wurden ohne einen Affinitätsmarker gebildet. Für die heterologe Überexpression wurden 750 ml

LB-Medium mit  $1/10$  Volumen einer Übernachtskultur beimpft und im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Die Expression des plasmidkodierten Gens wurde bei einer optischen Dichte ( $OD_{600nm}$ ) von 0,7-1,0 durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid) Endkonzentration für 3 h induziert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (10 min, 6000 rpm, 4 °C) und einmal in Puffer 1 für die Proteinaufreinigung gewaschen. Für die Aufreinigung der MipZ Proteine wurde Puffer B1 (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, auf pH 8,0 eingestellt mit NaOH), für ParB Puffer C1 (50 mM Natriumphosphat, pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 0,1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) und für FtsZ Puffer A1 (50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) verwendet. Das Zellpellet wurde gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Proteinaufreinigung bei – 80 °C gelagert.

#### 4.4.4 Proteinaufreinigung

Zur Reinigung von Wildtyp **MipZ** (CC2165) und seiner Derivate mit Hilfe eines Hexahistidin-Affinitätsmarkers wurden Rosetta<sup>TM</sup>2(DE3)pLysS-Zellen verwendet, die mit den Plasmiden pMT183 (MipZ), pDK2 (MipZ<sub>K13A</sub>), pMT413 (MipZ<sub>G14V</sub>), pMT414 (MipZ<sub>K18Q</sub>), pMT415 (MipZ<sub>D42A</sub>), pDK12 (MipZ<sub>T154L</sub>), pDK13 (MipZ<sub>N204E</sub>) oder pDK6 (MipZ<sub>A259D</sub>) transformiert waren. 7,5 g Zellen wurden in 75 ml Puffer B2 (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, auf pH 8,0 eingestellt mit NaOH, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10  $\mu$ g/ml DNase I, 100  $\mu$ g/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) resuspendiert und durch zwei French Press-Passagen bei 16000 psi aufgeschlossen. Nach Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation für 30 min bei 20000 x g wurde das Zelllysate auf eine mit Puffer B2 äquilibrierte Ni-NTA-Agarose-Matrix (3 ml Bettvolumen; Qiagen, Deutschland) aufgetragen. Die Säule wurde mit 150 ml Puffer B3 (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, auf pH 8,0 eingestellt mit NaOH) gewaschen und das Protein anschließend mit Puffer B4 (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, auf pH 8,0 eingestellt mit NaOH) in zwölf 1 ml-Aliquots eluiert. Die Eluatfraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf das Vorhandensein von MipZ getestet. Fraktionen, die ausreichende Mengen des Proteins enthielten, wurden vereinigt und für 19 h gegen 2 l Puffer B5 (50 mM Natriumphosphat pH 7,0, 5 mM  $MgCl_2$ , 0,1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) mit 50 mM NaCl dialysiert. Präzipitate wurden für 20 min bei 30000 g sedimentiert. Die Lösung wurde anschließend auf eine HiPrep 16/10 SP FF-Anionenaustauschersäule (GE Healthcare, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit Puffer B5 plus 50 mM NaCl äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 100 ml desselben Puffers gewaschen und anschließend das Protein mit 200 ml eines linearen NaCl-Gradienten (50-500 mM in Puffer B5) in 5 ml Fraktionen eluiert. Fraktionen, die das aufgereinigte Protein enthielten, wurden vereinigt und 19 h gegen 2 l Puffer B6 (50 mM Hepes/NaOH pH 7,2, 50 mM NaCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 0,1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) dialysiert. Das so aufgereinigte Protein wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Um **ParB** (CC3752) zu reinigen, wurden Zellen verwendet, die mit dem Plasmid pMT314 transformiert waren. Ein Gramm Zellen wurden in 2 ml Puffer C1 (50 mM Natriumphosphat pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 0,1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) plus 10  $\mu$ g/ml DNase I und 100  $\mu$ g/ml PMSF aufgenommen und anschließend durch zwei French Press-Passagen bei 16000 psi aufgebrochen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 20000 x g entfernt. Ammoniumsulfat wurde dann bis zu 30 % Sättigung zum Zelllysate zugefügt, präzipitierte Proteine durch Zentrifugation für 10 min bei 20000 x g entfernt und anschließend die Ammoniumsulfat-Konzentration auf 50 % Sättigung erhöht. Die Suspension wurde in drei

Aliquots aufgeteilt und gefälltes Protein für 20 min bei 30000 x g gesammelt. Jedes der resultierenden Pellets wurde in 5 ml Puffer C2 (50 mM Natriumphosphat pH 7,0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert und unlösliche Aggregate wurden durch einen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 30000 x g entfernt. Der Überstand wurde nacheinander auf eine mit Puffer C2 äquilibrierte HiLoad 16/60 Superdex 200 *prep grade*-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, Deutschland) aufgetragen, von der die Proteine mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert wurden. Die Fraktionen der drei Läufe, in denen das ParB-Protein enthalten war, wurden vereinigt und 19 h gegen 2 l Puffer C3 (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol) plus 50 mM NaCl dialysiert. Die Lösung wurde im Anschluß auf eine HiPrep 16/60 Heparin FF-Säule (GE Healthcare, Deutschland) aufgetragen, die mit demselben Puffer äquilibriert war. Nach einem Waschschrift mit Puffer C3 plus 50 mM NaCl wurde ParB mit 300 ml eines linearen NaCl-Gradienten (50-500 mM NaCl in Puffer C3) eluiert. Erneut wurden Fraktionen mit ausreichenden Mengen an ParB-Protein vereinigt und für 19 h gegen 2 l Puffer C4 (25 mM Natriumphosphat pH 7,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol) plus 25 mM NaCl dialysiert. Diese Lösung wurde dann auf eine HiPrep 16/10 SP FF Kationenaustauschersäule (GE Healthcare, Deutschland) aufgetragen, die mit demselben Puffer equilibriert war. Die Säule wurde mit 100 ml Puffer C4 plus 25 mM NaCl gewaschen und anschließend das Protein mittels 200 ml eines linearen NaCl-Gradienten (25-250 mM NaCl in Puffer C4) eluiert. Fraktionen, in denen ParB enthalten war, wurden vereinigt und mit Hilfe eines Amicon Ultra-15 Filters (10000 MWCo; Millipore, USA) durch Zentrifugation bei 4000 x g ankonzentriert. Schließlich wurde diese Lösung für 19 h gegen 2 l Puffer C5 (25 mM Hepes/NaOH pH 7,2, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 mM β-Mercaptoethanol) dialysiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Zur Reinigung von **FtsZ** (CC2540) wurden Zellen verwendet, die mit Plasmid pMT219 transformiert waren.

In Anlehnung an ein bereits beschriebenes Protokoll<sup>[147]</sup> wurden ein Gramm Zellen in 2,5 ml Puffer A1 (50 mM Tris/HCl pH 7,9, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 mM β-Mercaptoethanol) plus 50 mM KCl, 10 µg/ml DNase I und 100 µg/ml PMSF aufgenommen und anschließend durch zwei French Press-Passagen bei 16000 psi aufgebrochen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 20000 x g entfernt. Eine mit Puffer A2 (50 mM Tris/HCl pH 7,9, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 10 µg/ml PMSF, 1 mM β-Mercaptoethanol) plus 50 mM KCl äquilibrierte HiPrep 16/10 DEAE FF Anionenaustauschersäule (GE Healthcare, Deutschland) wurde mit dem Überstand beladen und in einem ersten Schritt mit 100 ml Puffer A2 plus 50 mM KCl gewaschen. Nach einem zweiten Waschschrift mit 100 ml A2 plus 80 mM KCl wurden die Proteine mit 300 ml eines linearen KCl-Gradienten (80-300 mM KCl in Puffer A2) eluiert. Fraktionen mit angereichertem FtsZ wurden vereinigt und mit Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 20 % versetzt. Präzipitierte Proteine wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 20000 x g pelletiert, in 10 ml Puffer A3 (50 mM Tris/HCl pH 7,9, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 10 µg/ml PMSF, 1 mM β-Mercaptoethanol) gelöst und in zwei Aliquots aufgeteilt. Diese wurden dann nacheinander auf eine HiLoad 16/60 Superdex 200 *prep grade*-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit Puffer A3 äquilibriert worden war.

Anschließend wurden die Proteine mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert und die Fraktionen der beiden Läufe, in denen FtsZ-Protein enthalten war, vereinigt und mittels eines Amicon Ultra-15 Filters (10000 MWCo; Millipore, USA) durch Zentrifugation bei 4000 x g ankonzentriert.

Diese Lösung wurde schließlich für 19 h gegen 2 l Puffer A4 (50 mM Hepes/NaOH pH 7,2, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) dialysiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Konzentration der gereinigten Proteine wurde mit dem Roti®-Nanoquant-Reagenz (Carl Roth, Deutschland) nach der Methode von Bradford<sup>[17]</sup> entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Zu 800  $\mu$ l Roti®-Nanoquant-Arbeitslösung wurden 200  $\mu$ l verdünnte Proteinlösung gegeben. Nach Mischen wurde die Absorption bei 590 nm und 450 nm gemessen und aus dem Quotienten  $A_{590}/A_{450}$  wurde mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden (1-100  $\mu$ g/ml) die Proteinkonzentration bestimmt.

### 4.4.5 Enzymatische Aktivitätstests

Die enzymatischen Aktivitäten der MipZ-Proteine und von FtsZ wurden, wie in Thanbichler und Shapiro<sup>[200]</sup> beschrieben, bestimmt.

Für die Bestimmung der ATPase-Aktivität der MipZ-Proteine wurden 6  $\mu$ M Protein für 10 min bei 30 °C in Puffer P (50 mM Hepes/NaOH pH 7,2, 50 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) vorinkubiert. Durch Zugabe von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP (25 Ci/mmol) in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Reaktion gestartet. In regelmäßigen Zeitintervallen wurden 2  $\mu$ l Probe entnommen und sofort auf eine PEI-Cellulose F DC-Platte (Merck, Deutschland) aufgetragen. Die Platten wurden in einem Fließmittel aus 0,5 M LiCl und 1 M Ameisensäure entwickelt, über Nacht getrocknet und auf einem Storage Phosphor Screen (GE Healthcare, Deutschland) für 2 h exponiert. Die Detektion und Quantifizierung des gebildeten [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ADP erfolgten mit Hilfe eines Storm 840 PhosphorImager (GE Healthcare, Deutschland) und ImageQuant 5.2 (GE Healthcare, Deutschland).

Um die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des MipZ-Dimers zu bestimmen, wurde MipZ in verschiedenen Konzentrationen in Puffer P, supplementiert mit 2 mM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP und 0,3 mg/ml BSA, inkubiert und die ATPase-Aktivität wie oben beschrieben, bestimmt. Zur Untersuchung des Einflusses von DNA und/oder ParB auf die Aktivität von MipZ, wurden den Reaktionsansätzen 0,2  $\mu$ M Plasmid DNA (pMT428, 3574 bp) und/oder 4,5  $\mu$ M ParB zugegeben.

Zur Messung der GTPase-Aktivität von FtsZ wurden 3  $\mu$ M Protein mit verschiedenen Komponenten für 10 min bei 30 °C in Puffer P vorinkubiert. Nachdem die Reaktion durch Zugabe von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GTP (25 Ci/mmol) zu 2 mM Endkonzentration gestartet worden war, wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben entnommen. Die produzierte Menge an [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-GDP wurde wie oben beschrieben bestimmt, mit der einzigen Ausnahme, dass die DC-Platten für nur 20 min auf dem Storage Phosphor Screen exponiert wurden.

### 4.4.6 Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR, *surface plasmon resonance*) ist eine Technologie zur Analyse der Interaktion von Biomolekülen und diente in dieser Arbeit sowohl der Analyse der Selbstinteraktion von MipZ als auch der Untersuchung der Interaktion von MipZ mit DNA und ParB. Alle Biosensorexperimente wurden mit einem Biacore T100 System (GE Healthcare, Deutschland) bei 25 °C und einer Flussrate von 30  $\mu$ l/min durchgeführt. Für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurde Puffer BC (50 mM Hepes/NaOH pH 7,2, 50 mM KCl, 5 mM  $MgCl_2$ ), für die Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion Puffer P2 (10 mM Hepes/NaOH pH 7,2, 150 mM NaCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 0,05 % Tween 20) verwendet. Alle Proteine wurden vor Verwendung gegen

Puffer BC bzw. P2 dialysiert.

Zur Analyse der MipZ-Selbstinteraktion und der Interaktion zwischen MipZ und ParB wurde MipZ bzw. ParB als Ligand kovalent an einen Sensor Chip CM5 (GE Healthcare, Deutschland) gekoppelt. Die Immobilisierung der Proteine erfolgte über Amin-Kopplung nach den Angaben des Herstellers. Für die Interaktionsanalyse wurden die MipZ-Proteine anschließend in Puffer BC verdünnt und für 90-180 s über die modifizierte Chipoberfläche geschickt. Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Nukleotide (ADP, ATP, ATP $\gamma$ S, AppNHp, mant-ATP) und Oligonukleotide auf die Interaktion, wurden diese dem Reaktionsansatz in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Nach jeder Bindereaktion wurde die Chipoberfläche durch Waschen mit Puffer BC plus 2 M NaCl bzw. 7 mM NaOH für 20 s regeneriert. Für die Kompetition der MipZ-ParB-Interaktion mit DNA wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid (oberer Strang: ran20, GCGGCGGCGGCGGCGGCGGC) verwendet.

Die MipZ-DNA-Interaktion wurde analysiert, indem verschiedene biotinylierte, doppelsträngige Oligonukleotide (oberer Strang: *parS*<sub>WT</sub>, GAGGCTTGTTTCACGTGAAACATCGG; *parS*<sub>mt</sub>, GAGGCTTGTTTGAGCTCAAACATCGG; ran1, GAGGCAGACTAGATCTTCTAGTTCGG; ran2, GTCGACAGAGTTCGCTAACATCGAGC) auf einem mit Streptavidin beschichteten Sensor-Chip SA (GE Healthcare, Deutschland) immobilisiert wurden. In allen Experimenten diente eine Zelle ohne immobilisierten Liganden als Referenz zur Detektion der unspezifischen Bindung von MipZ an die Chipoberfläche. Die Datenanalyse erfolgte mit der BIAevaluation Software (GE Healthcare, Deutschland).

#### 4.4.7 Elektrophoretischer Mobilitätsshift Assay (EMSA)

Die Fähigkeit von MipZ, an doppelsträngige Plasmid-DNA zu binden, wurde mit einem Mobilitätsshift Assay untersucht. Hierfür wurden 20 nM pMCS-2<sup>[97]</sup> mit 0-10  $\mu$ M MipZ und gegebenenfalls 0,75 mM ADP oder ATP in 50 mM Tris/HCl (pH 8,5) und 5 mM MgCl<sub>2</sub> gemischt. Die Reaktionsansätze wurden 10 min bei 25 °C inkubiert, mit 10-fach DNA-Probenpuffer gemischt und in einem 1 %-igen Agarosegel in 0,5-fach TB-Puffer (50 mM Tris/HCl, 50 mM Borat, pH 8,3) plus 1 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,5 mM ADP bzw. ATP elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele zur Visualisierung der DNA in 0,5-fach konzentriertem TB-Puffer mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem UV-Transilluminator analysiert.

## 4.5 Mikroskopische Methoden

### 4.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Mikroskopie wurden 2  $\mu$ l exponentiell wachsender *C. crescentus*- oder *E. coli*-Zellen auf einen mit 1 % Agarose beschichteten Objektträger aufgetropft und nach einer Minute Wartezeit mit einem Deckglas abgedeckt. Mikroskopiert wurde mit einem Axio Imager.M1-Mikroskop (Zeiss, Deutschland) und einem Zeiss Plan Apochromat 100x/1.40 Oil DIC Objektiv. Bilder wurden mit einer Cascade:1K CCD Kamera (Photometrics, USA) aufgenommen. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen wurden mit der Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Methode erstellt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde eine X-Cite®120PC Metallhalogenidlampe (EXFO, Kanada) in Kombination mit den Filtern ET-DAPI, ET-CFP (CFP) oder ET-YFP (eYFP) der Firma Chroma (USA) verwendet. Die Bildbearbeitung und Steuerung des Mikroskops erfolgten mit dem

Programm MetaMorph® 7.1.2 (Molecular Devices, USA). Zur Kollokalisierung von MipZ-YFP mit dem Nukleoid von *E. coli* wurden TOP10-Zellen mit den Plasmiden pDK2, pDK3, pDK7, pDK8 bzw. pDK9 transformiert und für 2 h in Gegenwart von 5 µg/ml Cephalexin und 0,1 % Arabinose gezogen, um die Zellteilung zu inhibieren und die Synthese der Fusionsproteine zu induzieren. Dreißig Minuten vor der mikroskopischen Analyse wurde der Kultur zur Kondensation der Nukleotide Chloramphenicol (100 µg/ml) zugesetzt. Zur Färbung der DNA wurde die Zellsuspension für 5 min mit 1,5 µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; Sigma Aldrich, Deutschland) inkubiert und anschließend mit einer Belichtung von 250 ms (DIC), 500 ms (DAPI), 2500 ms (eYFP) mikroskopiert.

Für die Lokalisation YFP-markierter MipZ-Derivate in *C. crescentus* wurden die Stämme MT177, MT178, MT179, MT197, DK2, SW12, SW13 und SW15 für 8 h in M2G Medium mit 0,3 % Xylose gezogen und anschließend bei 250 ms (DIC) und 2500 ms (eYFP) Belichtung mikroskopiert. Zur Messung der Fluoreszenzintensitätsprofile wurden diese Stämme für 4 h in M2G Medium plus 0,3 % Xylose inkubiert. Nach mikroskopischer Analyse mit 5000 ms (eYFP) Belichtung wurden anschließend Fluoreszenzprofile mit Hilfe der Linescan Funktion von Metamorph 7.1.2 (maximaler Y-Wert, Scanbreite: 8) gemessen.

Um CFP-ParB mit den MipZ-YFP Derivaten in *C. crescentus* zu koloalisieren, wurden Zellen der Stämme DK3, DK4, DK5, DK6, DK7 nach Anzucht in M2G<sub>N</sub>-Medium in PYE plus 10 mM NH<sub>4</sub>Cl und 0,3 % myo-Inositol verdünnt. Nach 6 h Inkubation wurde den Zellsuspensionen 0,3 % Xylose zugesetzt und für weitere 2 h inkubiert. Die mikroskopische Analyse erfolgte bei einer Belichtung von 5000 ms (eCFP) und 4000 ms (eYFP).

#### 4.5.2 FRAP

Die *in vivo*-Mobilität der MipZ-Derivate wurde mit Hilfe der FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)-Methode untersucht. Dazu wurde das oben beschriebene Mikroskop zusammen mit einem 488 nm Festkörperlaser und einem 2D-VisiFRAP Galvo System Multi-Point FRAP Modul (Visitron Systems, Deutschland) verwendet. Die Stämme MT177, MT178, MT179, MT197, DK2, SW12, SW13 und SW15 wurden für 4 h in M2G Medium plus 0,3 % Xylose gezogen. Anschließend wurden die Zellen auf einen Objektträger aufgetragen, der mit 1,5 % Agarose in M2G Medium beschichtet war, mit einem Deckglas abgedeckt und zusätzlich mit VLAP (Vaseline, Lanolin, Paraffin 1:1:1) versiegelt. Nach Aufnahme eines Bildes direkt vor dem Laserpuls (1500 ms eYFP) wurden Regionen von Interesse mit einem 30 ms Puls bei 1 % Laserintensität gebleicht. Sofort nach dem Bleichen und in regelmäßigen Intervallen danach wurden Bilder aufgenommen (2000 ms eYFP). Für jedem Zeitpunkt wurde die integrierte Fluoreszenzintensität der gesamten Zelle, der gebleichten Region und einer gleich großen nicht gebleichten Region mit Metamorph 7.1.2 gemessen. Nach Hintergrundkorrektur wurden die Fluoreszenzintensitäten der gebleichten und nicht gebleichten Region durch die Fluoreszenzintensität der gesamten Zellen geteilt. Dies diente der Korrektur des allgemeinen Bleichens, das während der Aufnahme der Bilder auftrat. Die durchschnittlichen relativen Fluoreszenzintensitäten von 17-30 Zellen wurden als Funktion der Zeit aufgetragen. Die Erholungsrate wurde mit Hilfe der SOLVER Funktion von Microsoft Excel bestimmt, indem die experimentellen Daten für die gebleichte Region auf eine exponentielle Funktion erster Ordnung ( $F(t) = A(1 - e^{-k \cdot t}) + F_0$ ) mit:  $F(t)$ , Fluoreszenz zum Zeitpunkt  $t$ ;  $A$ , maximale Intensität,  $k$ , Geschwindigkeitskonstante;  $F_0$ , relative Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0) gefittet wurden. In allen Fällen ergab sich ein Fit mit einem Regressionskoeffizienten  $R^2 \geq 0,95$ . Die Halbwertszeit, mit der das Fluoreszenzsignal nach dem Bleichen wieder zurückkehrte, wurde mit Hilfe der Gleichung  $t_{1/2} = \ln(0,5)/-k$  berechnet.



## 4.6 Fluoreszenzspektroskopische Methoden

### 4.6.1 Kinetische Messungen mittels Stopped-Flow

Experimente zur Untersuchung schneller Kinetiken wurden bei 30 °C an einem Hi-Tech Scientific SF-61MX Stopped-Flow Spektralfluorimeter (TgK Scientific, Großbritannien) in Puffer P (50 mM Hepes/NaOH pH 7,2, 50 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten im FRET (Fluoreszenzresonanzenergietransfer)-Modus mit einer Excitationswellenlänge von 297 nm in Kombination mit einem Cutoff-Filter der Grenzwellenlänge 360 nm. Im Allgemeinen wurden für jeden Messwert 10-20 Einzelmessungen gemittelt. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante ( $k_{\text{obs}}$ ) wurde bestimmt, indem die Daten auf eine einfache exponentielle Funktion unter Verwendung des Programms Kinetic Studio 2.0 (TgK Scientific, Großbritannien) gefittet wurden. Nachfolgende Analysen, z.B. zur Bestimmung der Assoziationskonstanten, erfolgten mit Origin 6.1 (OriginLab, USA).

### 4.6.2 Gleichgewichtsmessungen

Gleichgewichtsfluoreszenzmessungen wurden bei 30 °C an einem ISS PC1 Photon Counting-Spektralfluorimeter (ISS, USA) in Puffer P (50 mM Hepes/NaOH pH 7,2, 50 mM KCl, 10 mM KCl, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) durchgeführt. Die Bindung von mant-markierten Nukleotiden an MipZ wurde im FRET-Modus untersucht, wobei die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von MipZ bei 290 nm angeregt und die Emission der mant-Gruppe bei 450 nm detektiert wurde. Hierfür wurde 1  $\mu$ M Protein mit steigenden Konzentrationen an mant-ATP bzw. mant-ADP (Jena Bioscience, Deutschland) titriert. Die Daten wurden mit Hilfe von Origin 6.1 (OriginLab, USA) auf eine exponentielle Funktion erster Ordnung gefittet und daraus die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) berechnet.

Die Interaktion von MipZ mit ATP bzw. ADP wurde in Konkurrenz mit ANS (8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure; Sigma Aldrich, Deutschland) untersucht. Dazu wurden 2  $\mu$ M MipZ und 100  $\mu$ M ANS gemischt und mit steigenden Konzentrationen an ATP bzw. ADP titriert. Die Fluoreszenz von ANS wurde durch Licht einer Wellenlänge von 370 nm angeregt und die Emission bei 480 nm detektiert. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) bestimmt.

Für die Untersuchung der Bindung Fluorescein-markierter doppelsträngiger Oligonukleotide an MipZ wurden 10  $\mu$ M Protein mit 2 mM ATP für 5 min vorinkubiert und dann mit dem doppelsträngigen Oligonukleotid (oberer Strang: FITC-ran20, GCGGCGGCGGCGGCGGCGGC) titriert. Die Änderung der Fluoreszenz des DNA-Moleküls bei Bindung an MipZ wurde durch Excitation bei 495 nm und Emission bei 530 nm detektiert.

## 4.7 Bioinformatische Methoden

Alle Nukleotid- und Proteinsequenzen wurden über NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) eingeholt und mit Hilfe der Blastn- und Blastp-Algorithmen von NCBI sowie mittels des SMART-Algorithmus (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) ausgewertet. Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe von Clustal X 2.0<sup>[201]</sup> bzw. MAFFT v6<sup>[96]</sup> (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) erstellt. Die Pfam-Datenbank (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) wurde genutzt, um die Verbreitung von MipZ-Homologen zu untersuchen.

Zur phylogenetischen Einordnung der MipZ-Proteine in die Mrp/MinD-Familie wurden Aminosäuresequenzen von 15 Vertretern jeder Unterfamilie herangezogen und mittels MAFFT v6 miteinander verglichen. Die phylogenetische Analyse erfolgte nach der *Maximum Likelihood* (ML)-Methode unter Zuhilfenahme des RaxML-Programms<sup>[190]</sup> (<http://phylobench.vital-it.ch/raxml-bb/index.php>) und einer anschließenden Darstellung des Baums mit Hilfe von iTOL<sup>[116]</sup> (<http://itol.embl.de/>). Zur Verifizierung des Baums wurde darüber hinaus die *Neighbor Joining* (NJ)-Methode unter Zuhilfenahme des MAFFT v6-Programms verwendet.

Die Auswertung der Proteinkristallstrukturen erfolgte mit PyMOL Version 1.2r1 (Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC).

# A APPENDIX

## A.1 Verwendete Oligonukleotide, Plasmide und Stämme

**Tabelle A.1** Verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen

Oligonukleotid	Sequenz
CC2165-K13A-QCM1	CGTCGTCGGCAACGAGGCGGGCGGCGCTGGCAAGTCGACC
CC2165-K13A-QCM2	GGTCGACTTGCCAGCGCCGCCCGCCTCGTTGCCGACGACG
CC2165-rev	ATGAATTCATTA <sup>CT</sup> ACTGCGCCGCCAGCATCGTCTCGCC
CC2165-uni2	TTTTCATATGGCCGAAACGCGCGTTATCGTCG
CC2165-revHindIII	CCGCAAGCTTGTGTCGACGGCTGCGCCGCCAGCATCGTCTCGCC
Pxyl-1	CCCACATGTTAGCGCTACCAAGTGC
T7-seq	TAATACGACTCACTATAGGGC
AD-seq	AGATGGTGCACGATGCACAG
BD-seq	TTTTCGTTTTTAAACCTAAGAGTC
MipZ-KT25-rev	AAAAGAATTC <sup>CT</sup> TTTACTGCGCCGCCAGCATCGTCTCGCC
MipZ-KN125-rev	AAAAGAATTCGACTGCGCCGCCAGCATCGTCTCGCC
MipZ-UT18C-rev	AAAAGAATTCGATTACTGCGCCGCCAGCATCGTCTCGCC
MipZ-BACTH-for	TTTGGATCCCATGGCCGAAACGCGCGTTATCGTCG
His6-rev	TTTGGAGCTCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCTC

**Tabelle A.2** Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pAMIOI-4	Plasmid zur Integration eines Gens unter Kontrolle von $P_{iol}$ in <i>C. crescentus</i> , Gent <sup>R</sup>	A. Möll, nicht publiziert
pBAD24-CB	Plasmid zur Expression von Genen in <i>E. coli</i> unter Kontrolle von $P_{BAD}$ , Amp <sup>R</sup>	[142]
pBluescript II SK(+)	Klonierungsvektor, Amp <sup>R</sup>	Stratagene
pET21a(+)	Plasmid zur Überexpression von His6-markierten Proteinen in <i>E. coli</i> , Amp <sup>R</sup>	Novagen
pGADT7	Plasmid zur Konstruktion N-terminaler Fusionen an die DNA-Aktivierungsdomäne des GAL4 Proteins, Amp <sup>R</sup>	Clontech
pGBKT7	Plasmid zur Konstruktion N-terminaler Fusionen an die DNA-Bindedomäne des GAL4-Proteins, Kan <sup>R</sup>	Clontech
pKNT25	Plasmid zur Konstruktion C-terminaler Fusionen an das T25-Fragment der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase aus <i>B. pertussis</i> , Kan <sup>R</sup>	[95]
pKT25	Plasmid zur Konstruktion N-terminaler Fusionen an das T25-Fragment der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase aus <i>B. pertussis</i> , Kan <sup>R</sup>	[95]
pKT25-zip	pKT25 mit Leucinzipper-Domäne des GCN4 Proteins, Kan <sup>R</sup>	[95]
pUT18	Plasmid zur Konstruktion C-terminaler Fusionen an das T18-Fragment der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase aus <i>B. pertussis</i> , Amp <sup>R</sup>	[95]
pUT18C	Plasmid zur Konstruktion N-terminaler Fusionen an das T18-Fragment der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase aus <i>B. pertussis</i> , Amp <sup>R</sup>	[95]
pUT18C-zip	pUT18C mit Leucinzipper-Domäne des GCN4 Proteins, Amp <sup>R</sup>	[95]
pMT27	Integrationsplasmid für die induzierte Expression von Genen unter Kontrolle von $P_{xyb}$ , Kan <sup>R</sup>	[200]
pMT183	pET21a(+) CC2165	[200]
pMT219	pET21a(+) CC2540	[200]
pMT314	pET21a(+) CC3752	[200]
pMT413	pET21a(+) CC2165 <sub>G14V</sub>	M. Thanbichler
pMT414	pET21a(+) CC2165 <sub>K18Q</sub>	M. Thanbichler
pMT415	pET21a(+) CC2165 <sub>D42A</sub>	[200]
pMT428	$P_{gidA}$ in pBluescript II KS(+)	M. Thanbichler
pAG4	pGADT7 CC2165 <sub>T154L</sub>	A. Gutschmidt, Bachelorarbeit
pAG5	pGADT7 CC2165 <sub>N204E</sub>	A. Gutschmidt, Bachelorarbeit
pAG6	pGADT7 CC2165 <sub>A259D</sub>	A. Gutschmidt, Bachelorarbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pDK2	pBAD24-CB CC2165- <i>yfp</i>	diese Arbeit
pDK3	pBAD24-CB CC2165 <sub>D42A</sub> - <i>yfp</i>	diese Arbeit
pDK4	pMT27 CC2165 <sub>K13A</sub> - <i>yfp</i>	diese Arbeit
pDK6	pET21a(+) CC2165 <sub>A259D</sub>	diese Arbeit
pDK7	pBAD24-CB CC2165 <sub>K13A</sub> - <i>yfp</i>	diese Arbeit
pDK8	pBAD24-CB CC2165 <sub>G14V</sub> - <i>yfp</i>	diese Arbeit
pDK9	pBAD24-CB CC2165 <sub>K18Q</sub> - <i>yfp</i>	diese Arbeit
pDK10	pET21a(+) CC2165 <sub>K13A</sub>	diese Arbeit
pDK12	pET21a(+) CC2165 <sub>T154L</sub>	diese Arbeit
pDK13	pET21a(+) CC2165 <sub>N204E</sub>	diese Arbeit
pDK14	pGADT7 CC2165	diese Arbeit
pDK22	pGADT7 CC2165 <sub>D42A</sub>	diese Arbeit
pDK23	pGADT7 CC2165 <sub>G14V</sub>	diese Arbeit
pDK24	pGADT7 CC2165 <sub>K18Q</sub>	diese Arbeit
pDK25	pGADT7 CC2165 <sub>K13A</sub>	diese Arbeit
pDK34	pKT25 CC2165	diese Arbeit
pDK35	pKNT25 CC2165	diese Arbeit
pDK36	pUT18 CC2165	diese Arbeit
pDK37	pUT18C CC2165	diese Arbeit
pDK80	pMT27 CC2165- <i>bis<sub>6</sub></i>	diese Arbeit
pDK81	pMT27 CC2165 <sub>D42A</sub> - <i>bis<sub>6</sub></i>	diese Arbeit
pDK82	pMT27 CC2165 <sub>G14V</sub> - <i>bis<sub>6</sub></i>	diese Arbeit

**Tabelle A.3** Verwendete *Caulobacter* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
MT97	CB15N <i>mipZ</i> - <i>eyfp</i>	[200]
MT157	CB15N $\Delta mipZ$ $P_{nriX}::P_{nriX}-mipZ$ $xylX::mipZ$	[200]
MT177	CB15N $\Delta mipZ$ $P_{nriX}::P_{nriX}-mipZ$ $P_{xylX}::P_{xylX}-mipZ$ - <i>yfp</i>	[200]
MT178	CB15N $\Delta mipZ$ $P_{nriX}::P_{nriX}-mipZ$ $P_{xylX}::P_{xylX}-mipZ$ <sub>G14V</sub> - <i>yfp</i>	M. Thanbichler
MT179	CB15N $\Delta mipZ$ $P_{nriX}::P_{nriX}-mipZ$ $P_{xylX}::P_{xylX}-mipZ$ <sub>K18Q</sub> - <i>yfp</i>	M. Thanbichler
MT197	CB15N $\Delta mipZ$ $P_{nriX}::P_{nriX}-mipZ$ $P_{xylX}::P_{xylX}-mipZ$ <sub>D42A</sub> - <i>yfp</i>	[200]
SW12	CB15N $\Delta mipZ$ $P_{nriX}::P_{nriX}-mipZ$ $P_{xylX}::P_{xylX}-mipZ$ <sub>T154L</sub> - <i>venus</i>	S. Wick
SW13	CB15N $\Delta mipZ$ $P_{nriX}::P_{nriX}-mipZ$ $P_{xylX}::P_{xylX}-mipZ$ <sub>N204E</sub> - <i>venus</i>	S. Wick
SW15	CB15N $\Delta mipZ$ $P_{nriX}::P_{nriX}-mipZ$ $P_{xylX}::P_{xylX}-mipZ$ <sub>A259D</sub> - <i>venus</i>	S. Wick
DK2	CB15N $\Delta mipZ$ $P_{nriX}::P_{nriX}-mipZ$ $P_{xylX}::P_{xylX}-mipZ$ <sub>K13A</sub> - <i>yfp</i>	diese Arbeit
DK3	CB15N $\Delta mipZ$ $P_{nriX}::P_{nriX}-mipZ$ $P_{xylX}::P_{xylX}-mipZ$ <sub>K13A</sub> - <i>yfp</i> $P_{iol}::P_{iol}-cfp$ - <i>parB</i>	diese Arbeit

DK4	CB15N $\Delta mipZ$ P <sub>nrtX</sub> ::P <sub>nrtX</sub> - $mipZ$ P <sub>xyIX</sub> ::P <sub>xyIX</sub> - $mipZ$ -yfp P <sub>iol</sub> ::P <sub>iol</sub> -cfp-parB	diese Arbeit
DK5	CB15N $\Delta mipZ$ P <sub>nrtX</sub> ::P <sub>nrtX</sub> - $mipZ$ P <sub>xyIX</sub> ::P <sub>xyIX</sub> - $mipZ$ <sub>G14V</sub> -yfp P <sub>iol</sub> ::P <sub>iol</sub> -cfp-parB	diese Arbeit
DK6	CB15N $\Delta mipZ$ P <sub>nrtX</sub> ::P <sub>nrtX</sub> - $mipZ$ P <sub>xyIX</sub> ::P <sub>xyIX</sub> - $mipZ$ <sub>K18Q</sub> -yfp P <sub>iol</sub> ::P <sub>iol</sub> -cfp-parB	diese Arbeit
DK7	CB15N $\Delta mipZ$ P <sub>nrtX</sub> ::P <sub>nrtX</sub> - $mipZ$ P <sub>xyIX</sub> ::P <sub>xyIX</sub> - $mipZ$ <sub>D42A</sub> -yfp P <sub>iol</sub> ::P <sub>iol</sub> -cfp-parB	diese Arbeit
DK8	CB15N $\Delta mipZ$ P <sub>nrtX</sub> ::P <sub>nrtX</sub> - $mipZ$ P <sub>xyIX</sub> ::P <sub>xyIX</sub> - $mipZ$ <sub>T154L</sub> -venus P <sub>iol</sub> ::P <sub>iol</sub> -cfp-parB	diese Arbeit
DK9	CB15N $\Delta mipZ$ P <sub>nrtX</sub> ::P <sub>nrtX</sub> - $mipZ$ P <sub>xyIX</sub> ::P <sub>xyIX</sub> - $mipZ$ <sub>N204E</sub> -venus P <sub>iol</sub> ::P <sub>iol</sub> -cfp-parB	diese Arbeit
DK10	CB15N $\Delta mipZ$ P <sub>nrtX</sub> ::P <sub>nrtX</sub> - $mipZ$ P <sub>xyIX</sub> ::P <sub>xyIX</sub> - $mipZ$ <sub>A259D</sub> -venus P <sub>iol</sub> ::P <sub>iol</sub> -cfp-parB	diese Arbeit
DK22	CB15N $\Delta mipZ$ P <sub>nrtX</sub> ::P <sub>nrtX</sub> - $mipZ$ P <sub>xyIX</sub> ::P <sub>xyIX</sub> - $mipZ$ -bis6	diese Arbeit
DK23	CB15N $\Delta mipZ$ P <sub>nrtX</sub> ::P <sub>nrtX</sub> - $mipZ$ P <sub>xyIX</sub> ::P <sub>xyIX</sub> - $mipZ$ <sub>D42A</sub> -bis6	diese Arbeit
DK24	CB15N $\Delta mipZ$ P <sub>nrtX</sub> ::P <sub>nrtX</sub> - $mipZ$ P <sub>xyIX</sub> ::P <sub>xyIX</sub> - $mipZ$ <sub>G14V</sub> -bis6	diese Arbeit

## A.2 Proteinsequenzen für die phylogenetische Analyse

Nachfolgend sind die für die Aufstellung des phylogentischen Baumes der Mrp/MinD-Familie verwendeten Proteine mit ihren Zugangsnummern aufgeführt.

### ArsA-Proteine

*E. coli* UMN026 (CAR15136), *K. pneumoniae* MGH78578 (YP\_001338529), *S. putrefaciens* (ZP\_01704272), *A. ebreus* (YP\_002553592), *R. pickettii* (YP\_002980623), *G. capsiferriiformans* (YP\_003848161), *C. ferrooxidans* (ZP\_01386775), *M. gilvum* (YP\_001132924), *R. opacus* (YP\_002777213), *R. leguminosarum* (YP\_770079), *B. cereus* (ZP\_04292481), *M. magneticum* (YP\_421196), *P. limnophilus* (YP\_003628235), *V. bacterium* (ZP\_05056463), *R. rubrum* (YP\_426535)

### AF2380-Proteine

*A. fulgidus* (NP\_071203), *A. arabaticum* (YP\_003828365), *M. mabii* (YP\_003541452), *D. aespoeensis* (ZP\_06233786), *M. maripaludis* (YP\_001548512), *D. lykanthroporepellens* (YP\_003758110), *A. cellulolyticus* (ZP\_07328519), *D. psychrophila* (YP\_064075), *S. aciditrophicus* (YP\_462576), *H. orenii* (YP\_002509582), *M. barkeri* (YP\_305352), *T. maritima* (NP\_229096), *K. olearia* (YP\_002940835), *S. deleyianum* (YP\_003303268), *M. marisnigri* (YP\_001048330)

### ChlL-Proteine

*T. erythraeum* (YP\_721286), *T. elongates* (NP\_683137), *Nostoc* sp. PCC7120 (NP\_489118), *Synechocystis* sp. PCC6803 (NP\_442933), *G. violaceus* (NP\_925316), *C. parvum* (YP\_001997848), *R. centenum* (YP\_002298314), *H. modesticaldum* (YP\_001679876), *P. marinus* (YP\_293063), *C. aurantiacus* (YP\_00163614), *L. alexandrii* (ZP\_05112650), *R. palustris* (NP\_946891), *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 (YP\_001242230), *Roseovarius* sp. TM1035 (ZP\_01879032), *C. litoralis* (ZP\_01104350)

**MinD-Proteine**

*E. coli* O157 (NP\_287414), *K. pneumoniae* (YP\_002237813), *A. vinelandii* (YP\_002800636), *S. oneidensis* (NP\_718163), *N. punctiforme* (YP\_00186698), *Synechocystis* sp. PCC6803 (NP\_442592), *C. tetani* (NP\_782631), *B. subtilis* (NP\_390677), *R. palustris* (YP\_782037), *B. japonicum* (NP\_770852), *B. suis* (NP\_699517), *R. solanacearum* (ZP\_00946462), *N. meningitides* (NP\_273229), *B. petrii* (YP\_001629495), *S. cellulosum* (YP\_001614005)

**MipZ-Proteine**

*C. crescentus* (DAA05781), *Caulobacter* K31 (ABZ72275), *H. neptunium* (ABI75406), *R. rubrum* (YP\_427205), *Z. mobilis* (YP\_162070), *B. japonicum* (BAC50426), *P. ζucineum* (YP\_002130137), *Roseovarius* sp. 217 (ZP\_01036826), *M. maris* (YP\_756949), *S. stellata* (ZP\_01748170), *P. denitrificans* (ABL7195), *R. pomeroyi* (YP\_165944), *R. canadensis* (ABV73095), *M. gryphiswaldense* (CAM75400), *R. bellii* (YP\_001496561)

**MotR-Proteine**

*P. aeruginosa* (AAC6254), *Oceanobacter* sp. (ZP\_0130683), *C. japonicas* (YP\_001982607), *Shewanella* sp. MR4 (YP\_73343), *V. fischeri* (YP\_205218), *B. cellulosilyticus* (ZP\_06362163), *Z. mobilis* (YP\_003225769), *B. pilosicoli* (YP\_003786673), *B. garinii* (ZP\_03540558), *Nitratiruptor* sp. (YP\_001356088), *S. deleyianum* (YP\_003303366), *H. pylori* (YP\_003057210), *D. aespoeensis* (ZP\_06231462)

**Mrp-Proteine**

*E. coli* K12 (AAC75174), *K. pneumoniae* (YP\_002920420), *S. odorifera* (ZP\_06641243), *S. elongates* (YP\_171154), *Synechocystis* sp. PCC6803 (NP\_442227), *N. punctiforme* (YP\_001868441), *Geobacillus* sp. (YP\_003245724), *C. botulinum* (YP\_001785417), *B. thuringiensis* (ZP\_04143615), *Rhizobium* sp. (YP\_002824990), *R. palustris* (YP\_531939), *B. pinnipedialis* (ZP\_05169072), *Ruegeria* sp. (YP\_612390), *M. xanthus* (YP\_631985), *W. succinogenes* (NP\_908048)

**NifH-Proteine**

*A. vinelandii* (ACO76403), *A. vinosum* (YP\_003443837), *K. pneumoniae* (YP\_002237565), *Magnetococcus* sp. (YP\_86511), *M. tundripaludum* (ZP\_0765412), *D. acetiphilus* (YP\_003503778), *Frankia* sp. (YP\_483563), *A. ferrooxidans* (YP\_002219685), *B. japonicum* (NP\_768409), *D. hafniense* (YP\_520504), *A. variabilis* (YP\_324741), *Synechococcus* sp. (ZP\_05039115), *L. cholodnii* (YP\_001790463), *B. vietnamensis* (YP\_001115195), *R. palustris* (ZP\_06358438)

**ParA-Proteine**

*C. crescentus* (AAB51267), *H. neptunium* (YP\_762232), *M. magneticum* (YP\_419367), *B. subtilis* (NP\_391977), *P. ζucineum* (YP\_002132359), *E. faecalis* (NP\_816894), *N. meningitides* (YP\_003083986), *Roseovarius* sp. (ZP\_01037986), *P. denitrificans* (YP\_913819), *R. palustris* (YP\_779325), *R. canadensis* (YP\_001491792), *S. coelicolor* (AAF16005), *B. pertussis* (NP\_878922), *M. xanthus* (YP\_635580), *T. thermophilus* (YP\_005574)

### A.3 Daten zur Kristallisation

**Tabelle A.4** Datenstatistiken zur Strukturaufklärung von apo-MipZ (Monomer) und MipZ<sub>D42A</sub> (Dimer)

Kristall	MipZ-1 (Monomer)	MipZ-2 (Monomer)	MipZ:ATP $\gamma$ S, Mg <sup>2+</sup> (Dimer)
<b>Kristallographische Daten</b>			
Space Group	H3	H32	P4 <sub>1</sub>
Cell Dimensions (Å)	a=b=81,33 c=124,21	a=b=124,67 c=239,05	a=b=57,12 c=164,86
$\lambda$ (Å)	0,9747	0,8726	0,8726
Resolution (Å)	1,6	1,8	2,8
I/ $\sigma$ I	11,6 (5,1)	21,0 (4,9)	8,8 (2,7)
R <sub>m</sub> (%)	0,090 (0,290)	0,057 (0,383)	0,079 (0,349)
Multiplicity	5,4 (5,5)	6,0 (5,5)	2,5 (2,5)
Completeness (%)	99,6 (99,6)	99,9 (100,0)	94,2 (96,5)
<b>Refinement Statistics</b>			
Model	4-273, 353 H <sub>2</sub> O	Chain A: 2-287 Chain B: 4-287, 420 H <sub>2</sub> O	Chain A: 3-148, 151-191, 193-270 Chain B: 3-175, 178-240, 243-272, 2 ATP, 59 H <sub>2</sub> O
Diffraction Data	1	2	3
R-factor, R-free	0,126; 0,175	0,185; 0,230	0,185; 0,240
B average/bonded	23,7 Å <sup>2</sup> , 3,0 Å <sup>2</sup>	30,8 Å <sup>2</sup> , 1,6 Å <sup>2</sup>	49,3 Å <sup>2</sup> , 7,2 Å <sup>2</sup>
Geometry bonds/angles	0,03 Å, 2,474°	0,012 Å, 1,294°	0,010 Å, 1,530°
Ramachandran	95,8; 0,0	98,0; 0,9	86,5; 0,0
PDB ID	2XJ4	2XIT	2XJ9

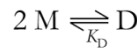


## A.4 Herleitung der Dimerisierungsgleichung

In unserem Model gehen wir davon aus, dass MipZ ATP-abhängig dimerisiert und nur dieses Dimer zur ATP-Hydrolyse befähigt ist. Die apparente Hydrolyserate ist somit gegeben durch

$$k_{app} = 2k_{cat} * [D] \quad (a.1)$$

Das Gleichgewicht der ATP-abhängigen Dimerisierung von MipZ



ergibt eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$ ,

$$K_D = \frac{[M]^2}{[D]} \quad (a.2)$$

wobei  $[M]$  bzw.  $[D]$  die Konzentration an Monomeren bzw. Dimeren darstellt. Die Menge an monomerem MipZ  $M$  ergibt sich aus der Differenz der gesamten Menge an MipZ Molekülen  $M_t$  und der Menge an Dimeren

$$M = M_t - 2D \quad (a.3)$$

Zusammen mit Gleichung (a.2) ergibt sich so

$$[D] = \frac{([M_t] - 2[D])^2}{K_D} \quad (a.4)$$

Durch Lösung dieser quadratischen Gleichung ergibt sich

$$[D] = \frac{1}{2} + \frac{K_D - \sqrt{8[M_t]K_D + K_D^2}}{8[M_t]} \quad (a.5)$$

Durch Einsetzen in Gleichung (a.1) ergibt sich damit

$$k_{app} = 2k_{cat} \left( \frac{1}{2} + \frac{K_D - \sqrt{8[M_t]K_D + K_D^2}}{8[M_t]} \right) \quad (a.6)$$



# LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams DW, and Errington J (2009) Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Micro* 7, 642-653
2. Allard JF, and Cytrynbaum EN (2009) Force generation by a dynamic Z-ring in *Escherichia coli* cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 145-150
3. Anderson DE, Gueiros-Filho FJ, and Erickson HP (2004) Assembly dynamics of FtsZ Rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *J Bacteriol* 186, 5775-5781
4. Ausmees N, Kuhn JR, and Jacobs-Wagner C (2003) The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* 115, 705-713
5. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JD, Smith JA, and Struhl K (2002) Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. (5 edn), John Wiley and Sons Inc., New York
6. Barilla D, Carmelo E, and Hayes F (2007) The tail of the ParG DNA segregation protein remodels ParF polymers and enhances ATP hydrolysis via an arginine finger-like motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1811-1816
7. Barilla D, Rosenberg MF, Nobbmann U, and Hayes F (2005) Bacterial DNA segregation dynamics mediated by the polymerizing protein ParF. *EMBO J* 24, 1453-1464
8. Bernhardt TG, and de Boer PA (2005) SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over Chromosomes in *E. coli*. *Mol Cell* 18, 555-564
9. Bi EF, and Lutkenhaus J (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* 354, 161-164
10. Bollenbach T, Pantazis P, Kicheva A, Bökel C, González-Gaitán M, and Jülicher F (2008) Precision of the Dpp gradient. *Development* 135, 1137-1146
11. Bork P, Sander C, and Valencia A (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7290-7294
12. Bos JL, Rehmann H, and Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877
13. Bouet JY, Surtees JA, and Funnell BE (2000) Stoichiometry of P1 plasmid partition complexes. *J Biol Chem* 275, 8213-8219
14. Boutte CC, Srinivasan BS, Flannick JA, Novak AF, Martens AT, Batzoglou S, Viollier PH, and Crosson S (2008) Genetic and computational identification of a conserved bacterial metabolic module. *PLoS Genet* 4, e1000310
15. Bowman GR, Comolli LR, Gaietta GM, Fero M, Hong SH, Jones Y, Lee JH, Downing KH, Ellisman MH, McAdams HH, and Shapiro L (2010) *Caulobacter* PopZ forms a polar subdomain dictating sequential changes in pole composition and function. *Mol Microbiol* 76, 173-189

16. Bowman GR, Comolli LR, Zhu J, Eckart M, Koenig M, Downing KH, Moerner WE, Earnest T, and Shapiro L (2008) A polymeric protein anchors the chromosomal origin/ParB complex at a bacterial cell pole. *Cell* 134, 945-955
17. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
18. Bramkamp M, Emmins R, Weston L, Donovan C, Daniel RA, and Errington J (2008) A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Mol Microbiol* 70, 1556-1569
19. Breier AM, and Grossman AD (2007) Whole-genome analysis of the chromosome partitioning and sporulation protein Spo0J (ParB) reveals spreading and origin-distal sites on the *Bacillus subtilis* chromosome. *Mol Microbiol* 64, 703-718
20. Brown GC, and Kholodenko BN (1999) Spatial gradients of cellular phospho-proteins. *FEBS Lett* 457, 452-454
21. Campbell CS, and Mullins RD (2007) *In vivo* visualization of type II plasmid segregation: bacterial actin filaments pushing plasmids. *J Cell Biol* 179, 1059-1066
22. Castaing JP, Bouet JY, and Lane D (2008) F plasmid partition depends on interaction of SopA with non-specific DNA. *Mol Microbiol* 70, 1000-1011
23. Chen Y, Bjornson K, Redick SD, and Erickson HP (2005) A rapid fluorescence assay for FtsZ assembly indicates cooperative assembly with a dimer nucleus. *Biophys J* 88, 505-514
24. Chen Y, and Erickson HP (2009) FtsZ filament dynamics at steady state: subunit exchange with and without nucleotide hydrolysis. *Biochemistry* 48, 6664-6673
25. Chen Y, and Schier AF (2001) The zebrafish nodal signal Squint functions as a morphogen. *Nature* 411, 607-610
26. Chen YE, Tropini C, Jonas K, Tsokos CG, Huang KC, and Laub MT (2011) Spatial gradient of protein phosphorylation underlies replicative asymmetry in a bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1052-1057
27. Chisholm RH, Hughes BD, and Landman KA (2010) Building a Morphogen Gradient without Diffusion in a Growing Tissue. *PLoS One* 5, e12857
28. Cho H, McManus HR, Dove SL, and Bernhardt TG (2011) Nucleoid occlusion factor SlmA is a DNA-activated FtsZ polymerization antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3773-3778
29. Choi CL, Claridge SA, Garner EC, Alivisatos AP, and Mullins RD (2008) Protein-nanocrystal conjugates support a single filament polymerization model in R1 plasmid segregation. *J Biol Chem* 283, 28081-28086
30. Cordell SC, Anderson RE, and Lowe J (2001) Crystal structure of the bacterial cell division inhibitor MinC. *EMBO J* 20, 2454-2461
31. Correa NE, Peng F, and Klose KE (2005) Roles of the regulatory proteins FlhF and FlhG in the *Vibrio cholerae* flagellar transcription hierarchy. *J Bacteriol* 187, 6324-6332
32. Curtis PD, and Brun YV (2010) Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 13-41
33. Dajkovic A, Lan G, Sun SX, Wirtz D, and Lutkenhaus J (2008) MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. *Curr Biol* 18, 235-244
34. Dajkovic A, and Lutkenhaus J (2006) Z ring as executor of bacterial cell division. *J Mol Microbiol Biotechnol* 11, 140-151

35. Dajkovic A, Mukherjee A, and Lutkenhaus J (2008) investigation of regulation of FtsZ assembly by SulA and development of a model for FtsZ polymerization. *J Bacteriol* 190, 2513-2526
36. Davis MA, Martin KA, and Austin SJ (1992) Biochemical activities of the ParA partition protein of the P1 plasmid. *Mol Microbiol* 6, 1141-1147
37. de Boer PA, Crossley RE, and Rothfield LI (1989) A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *E. coli*. *Cell* 56, 641-649
38. Deich J, Judd EM, McAdams HH, and Moerner WE (2004) Visualization of the movement of single histidine kinase molecules in live *Caulobacter* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15921-15926
39. Dessaud E, Yang LL, Hill K, Cox B, Ulloa F, Ribeiro A, Mynett A, Novitch BG, and Briscoe J (2007) Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 450, 717-720
40. Donovan C, Schwaiger A, Kramer R, and Bramkamp M (2010) Subcellular localization and characterization of the ParAB system from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 192, 3441-3451
41. Easter J, Jr., and Gober JW (2002) ParB-stimulated nucleotide exchange regulates a switch in functionally distinct ParA activities. *Mol Cell* 10, 427-434
42. Ebersbach G, Briegel A, Jensen GJ, and Jacobs-Wagner C (2008) A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in *Caulobacter*. *Cell* 134, 956-968
43. Ebersbach G, and Gerdes K (2004) Bacterial mitosis: partitioning protein ParA oscillates in spiral-shaped structures and positions plasmids at mid-cell. *Mol Microbiol* 52, 385-398
44. Ebersbach G, and Gerdes K (2001) The double *par* locus of virulence factor pB171: DNA segregation is correlated with oscillation of ParA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15078-15083
45. Ebersbach G, Ringgaard S, Moller-Jensen J, Wang Q, Sherratt DJ, and Gerdes K (2006) Regular cellular distribution of plasmids by oscillating and filament-forming ParA ATPase of plasmid pB171. *Mol Microbiol* 61, 1428-1442
46. Eccleston JF, Moore KJ, Morgan L, Skinner RH, and Lowe PN (1993) Kinetics of interaction between normal and proline 12 Ras and the GTPase-activating proteins, p120-GAP and neurofibromin: the significance of the intrinsic GTPase rate in determining the transforming ability of Ras. *J Biol Chem* 268, 27012-27019
47. Ely B (1991) Genetics of *Caulobacter crescentus*. *Methods Enzymol* 204, 372-384
48. Erickson HP (2009) Modeling the physics of FtsZ assembly and force generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 9238-9243
49. Erickson HP, Anderson DE, and Osawa M (2010) FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 504-528
50. Evinger M, and Agabian N (1977) Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J Bacteriol* 132, 294-301
51. Fekete RA, and Chattoraj DK (2005) A cis-acting sequence involved in chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 55, 175-183

52. Figge RM, Easter J, and Gober JW (2003) Productive interaction between the chromosome partitioning proteins, ParA and ParB, is required for the progression of the cell cycle in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 47, 1225-1237
53. Fogel MA, and Waldor MK (2006) A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev* 20, 3269-3282
54. Ford B, Boykevisch S, Zhao C, Kunzelmann S, Bar-Sagi D, Herrmann C, and Nassar N (2009) Characterization of a Ras mutant with identical GDP- and GTP-bound structures. *Biochemistry* 48, 11449-11457
55. Fuller BG, Lampson MA, Foley EA, Rosasco-Nitcher S, Le KV, Tobelmann P, Brautigan DL, Stukenberg PT, and Kapoor TM (2008) Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient. *Nature* 453, 1132-1136
56. Fung E, Bouet JY, and Funnell BE (2001) Probing the ATP-binding site of P1 ParA: partition and repression have different requirements for ATP binding and hydrolysis. *EMBO J* 20, 4901-4911
57. Garner EC, Campbell CS, Weibel DB, and Mullins RD (2007) Reconstitution of DNA segregation driven by assembly of a prokaryotic actin homolog. *Science* 315, 1270-1274
58. Gerdes K, Howard M, and Szardenings F (2010) Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation. *Cell* 141, 927-942
59. Gerdes K, Moller-Jensen J, and Bugge Jensen R (2000) Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol* 37, 455 - 466
60. Gietz RD, Woods RA, Guthrie C, and Gerald RF (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87-96
61. Godfrin-Estevenson AM, Pasta F, and Lane D (2002) The *parAB* gene products of *Pseudomonas putida* exhibit partition activity in both *P. putida* and *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 43, 39-49
62. Goehring NW, and Beckwith J (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr Biol* 15, R514-R526
63. Gordon S, Rech J, Lane D, and Wright A (2004) Kinetics of plasmid segregation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 51, 461-469
64. Gregory JA, Becker EC, and Pogliano K (2008) *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes Dev* 22, 3475-3488
65. Gurdon JB, and Bourillot PY (2001) Morphogen gradient interpretation. *Nature* 413, 797-803
66. Hahn TR, and Song PS (1981) Hydrophobic properties of phytochrome as probed by 8-anilino-naphthalene-1-sulfonate fluorescence. *Biochemistry* 20, 2602-2609
67. Hamer R, Chen P-Y, Armitage J, Reinert G, and Deane C (2010) Deciphering chemotaxis pathways using cross species comparisons. *BMC Syst Biol* 4, 3
68. Hatano T, and Niki H (2010) Partitioning of P1 plasmids by gradual distribution of the ATPase ParA. *Mol Microbiol* 78, 1182-1198
69. Henrici AT, and Johnson DE (1935) Studies of freshwater bacteria: II. stalked bacteria, a new order of *Schizomycetes*. *J Bacteriol* 30, 61-93
70. Hester CM, and Lutkenhaus J (2007) Soj (ParA) DNA binding is mediated by conserved arginines and is essential for plasmid segregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 20326-20331

71. Hiraga S, Niki H, Ogura T, Ichinose C, Mori H, Ezaki B, and Jaffe A (1989) Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J Bacteriol* 171, 1496-1505
72. Ho TQ, Zhong Z, Aung S, and Pogliano J (2002) Compatible bacterial plasmids are targeted to independent cellular locations in *Escherichia coli*. *EMBO J* 21, 1864-1872
73. Hu Z, Gogol EP, and Lutkenhaus J (2002) Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6761-6766
74. Hu Z, and Lutkenhaus J (2001) Topological regulation of cell division in *E. coli*: spatiotemporal oscillation of MinD requires stimulation of its ATPase by MinE and phospholipid. *Mol Cell* 7, 1337-1343
75. Hu Z, Mukherjee A, Pichoff S, and Lutkenhaus J (1999) The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14819-14824
76. Hu Z, Saez C, and Lutkenhaus J (2003) Recruitment of MinC, an inhibitor of Z-ring formation, to the membrane in *Escherichia coli*: role of MinD and MinE. *J Bacteriol* 185, 196-203
77. Huang KC, Meir Y, and Wingreen NS (2003) Dynamic structures in *Escherichia coli*: spontaneous formation of MinE rings and MinD polar zones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12724-12728
78. Huecas S, Llorca O, Boskovic J, Martin-Benito J, Valpuesta JM, and Andreu JM (2008) Energetics and geometry of FtsZ polymers: nucleated self-assembly of single protofilaments. *Biophys J* 94, 1796-1806
79. Hui MP, Galkin VE, Yu X, Stasiak AZ, Stasiak A, Waldor MK, and Egelman EH (2010) ParA2, a *Vibrio cholerae* chromosome partitioning protein, forms left-handed helical filaments on DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 4590-4595
80. Huitema E, Pritchard S, Matteson D, Radhakrishnan SK, and Viollier PH (2006) Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell* 124, 1025-1037
81. Hutchinson JP, and Eccleston JF (2000) Mechanism of nucleotide release from Rho by the GDP dissociation stimulator protein. *Biochemistry* 39, 11348-11359
82. Ireton K, Gunther NWt, and Grossman AD (1994) *spo0J* is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 176, 5320-5329
83. Jakimowicz D, Zydek P, Kois A, Zakrzewska-Czerwinska J, and Chater KF (2007) Alignment of multiple chromosomes along helical ParA scaffolding in sporulating *Streptomyces* hyphae. *Mol Microbiol* 65, 625-641
84. James P, Halladay J, and Craig EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436
85. Jensen RB (2006) Coordination between chromosome replication, segregation, and cell division in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 188, 2244-2253
86. Jensen RB, and Gerdes K (1999) Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: ParM partitioning protein of plasmid R1 co-localizes with its replicon during the cell cycle. *EMBO J* 18, 4076-4084
87. Jensen RB, and Gerdes K (1997) Partitioning of plasmid R1: the ParM protein exhibits ATPase activity and interacts with the centromere-like ParR-parC complex. *J Mol Biol* 269, 505-513

88. Jensen RB, and Shapiro L (1999) The *Caulobacter crescentus smc* gene is required for cell cycle progression and chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 10661-10666
89. Johnson JE, Lackner LL, Hale CA, and de Boer PAJ (2004) ZipA is required for targeting of <sup>32</sup>PMinC/DicB, but not <sup>32</sup>PMinC/MinD, complexes to septal ring assemblies in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 2418-2429
90. Jun S, and Mulder B (2006) Entropy-driven spatial organization of highly confined polymers: lessons for the bacterial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12388-12393
91. Kabsch W, and Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637
92. Kadoya R, Baek JH, Sarker A, and Chatteraj DK (2011) Participation of a chromosome segregation protein ParAI of *Vibrio cholerae* in chromosome replication. *J Bacteriol*, JB.01067-01010
93. Kaláb P, Pralle A, Isacoff EY, Heald R, and Weis K (2006) Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature* 440, 697-701
94. Kalab P, Weis K, and Heald R (2002) Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* 295, 2452-2456
95. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, and Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5752-5756
96. Katoh K, Misawa K, Kuma Ki, and Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30, 3059-3066
97. Kelly AJ, Sackett MJ, Din N, Quardokus E, and Brun YV (1998) Cell cycle-dependent transcriptional and proteolytic regulation of FtsZ in *Caulobacter*. *Genes Dev* 12, 880-893
98. Kim HJ, Calcutt MJ, Schmidt FJ, and Chater KF (2000) Partitioning of the linear chromosome during sporulation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves an *oriC*-linked *parAB* locus. *J Bacteriol* 182, 1313-1320
99. Koonin EV (1993) A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *J Mol Biol* 229, 1165-1174
100. Koonin EV, Wolf YI, and Aravind L (2000) Protein fold recognition using sequence profiles and its application in structural genomics. *Adv Protein Chem* 54, 245-275
101. Kruse T, Moller-Jensen J, Lobner-Olesen A, and Gerdes K (2003) Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J* 22, 5283 - 5292
102. Lackner LL, Raskin DM, and de Boer PA (2003) ATP-dependent interactions between *Escherichia coli* Min proteins and the phospholipid membrane *in vitro*. *J Bacteriol* 185, 735-749
103. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
104. Lam H, Schofield WB, and Jacobs-Wagner C (2006) A landmark protein essential for establishing and perpetuating the polarity of a bacterial cell. *Cell* 124, 1011-1023
105. Lan G, Dajkovic A, Wirtz D, and Sun SX (2008) Polymerization and bundling kinetics of FtsZ filaments. *Biophys J* 95, 4045-4056



106. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, and Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948
107. Larsen RA, Cusumano C, Fujioka A, Lim-Fong G, Patterson P, and Pogliano J (2007) Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev* 21, 1340-1352
108. Laub MT, Chen SL, Shapiro L, and McAdams HH (2002) Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4632-4637
109. Laub MT, McAdams HH, Feldblyum T, Fraser CM, and Shapiro L (2000) Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* 290, 2144-2148
110. Laub MT, Shapiro L, and McAdams HH (2007) Systems Biology of *Caulobacter*. *Annu Rev Genet* 41, 429-441
111. Lee PS, and Grossman AD (2006) The chromosome partitioning proteins Soj (ParA) and Spo0J (ParB) contribute to accurate chromosome partitioning, separation of replicated sister origins, and regulation of replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 60, 853-869
112. Lee S, and Price CW (1993) The *minCD* locus of *Bacillus subtilis* lacks the *minE* determinant that provides topological specificity to cell division. *Mol Microbiol* 7, 601-610
113. Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, and Aravind L (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* 317, 41-72
114. Leonard TA, Butler PJ, and Lowe J (2005) Bacterial chromosome segregation: structure and DNA binding of the Soj dimer--a conserved biological switch. *EMBO J* 24, 270-282
115. Leonard TA, Butler PJG, and Lowe J (2004) Structural analysis of the chromosome segregation protein Spo0J from *Thermus thermophilus*. *Mol Microbiol* 53, 419-432
116. Letunic I, and Bork P (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* 23, 127-128
117. Lewis RA, Bignell CR, Zeng W, Jones AC, and Thomas CM (2002) Chromosome loss from *par* mutants of *Pseudomonas putida* depends on growth medium and phase of growth. *Microbiology* 148, 537-548
118. Li Z, Trimble MJ, Brun YV, and Jensen GJ (2007) The structure of FtsZ filaments *in vivo* suggests a force-generating role in cell division. *EMBO J* 26, 4694-4708
119. Lim GE, Derman AI, and Pogliano J (2005) Bacterial DNA segregation by dynamic SopA polymers. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 17658-17663
120. Lipkow K, and Odde DJ (2008) Model for protein concentration gradients in the cytoplasm. *Cell Mol Bioeng* 1, 84-92
121. Livny J, Yamaichi Y, and Waldor MK (2007) Distribution of centromere-like *parS* sites in bacteria: insights from comparative genomics. *J Bacteriol* 189, 8693-8703
122. Loose M, Fischer-Friedrich E, Ries J, Kruse K, and Schwille P (2008) Spatial regulators for bacterial cell division self-organize into surface waves *in vitro*. *Science* 320, 789-792
123. Lowe J, and Amos LA (1998) Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391, 203-206
124. Lu C, Reedy M, and Erickson HP (2000) Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J Bacteriol* 182, 164-170

125. Lutkenhaus J (2007) Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem* 76, 539-562
126. Ma L, King GF, and Rothfield L (2004) Positioning of the MinE binding site on the MinD surface suggests a plausible mechanism for activation of the *Escherichia coli* MinD ATPase during division site selection. *Mol Microbiol* 54, 99-108
127. Maiti R, Van Domselaar GH, Zhang H, and Wishart DS (2004) SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Res* 32, W590-W594
128. Marczyński GT (1999) Chromosome methylation and measurement of faithful, once and only once per cell cycle chromosome replication in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 181, 1984-1993
129. Margolin W (2006) Bacterial division: another way to box in the ring. *Curr Biol* 16, R881-884
130. Margolin W (2005) FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 862-871
131. Marks ME, Castro-Rojas CM, Teiling C, Du L, Kapatral V, Walunas TL, and Crosson S (2010) The genetic basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 192, 3678-3688
132. Marston AL, and Errington J (1999) Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation. *Mol Cell* 4, 673-682
133. Marston AL, Thomaides HB, Edwards DH, Sharpe ME, and Errington J (1998) Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev* 12, 3419-3430
134. Martin ME, Trimble MJ, and Brun YV (2004) Cell cycle-dependent abundance, stability and localization of FtsA and FtsQ in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 54, 60-74
135. Martin SG, and Berthelot-Grosjean M (2009) Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature* 459, 852-856
136. Masui R, and Kuramitsu S (1998) Probing of DNA-binding sites of *Escherichia coli* RecA protein utilizing 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid. *Biochemistry* 37, 12133-12143
137. Meinhardt H, and de Boer PA (2001) Pattern formation in *Escherichia coli*: a model for the pole-to-pole oscillations of Min proteins and the localization of the division site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14202-14207
138. Michie KA, and Lowe J (2006) Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *Annu Rev Biochem* 75, 467-492
139. Mingorance J, Tadros M, Vicente M, González JM, Rivas G, and Vélez M (2005) Visualization of single *Escherichia coli* FtsZ filament dynamics with atomic force microscopy. *J Biol Chem* 280, 20909-20914
140. Mohl DA, Easter J, Jr., and Gober JW (2001) The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 42, 741-755
141. Mohl DA, and Gober JW (1997) Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. *Cell* 88, 675-684
142. Möll A, and Thanbichler M (2009) FtsN-like proteins are conserved components of the cell division machinery in proteobacteria. *Mol Microbiol* 72, 1037-1053

143. Møller-Jensen J, Borch J, Dam M, Jensen RB, Roepstorff P, and Gerdes K (2003) Bacterial mitosis: ParM of Plasmid R1 moves plasmid DNA by an actin-like insertional polymerization mechanism. *Mol Cell* 12, 1477-1487
144. Moller-Jensen J, Jensen RB, Lowe J, and Gerdes K (2002) Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *EMBO J* 21, 3119-3127
145. Moseley JB, Mayeux A, Paoletti A, and Nurse P (2009) A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature* 459, 857-860
146. Mott ML, and Berger JM (2007) DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 5, 343-354
147. Mukherjee A, and Lutkenhaus J (1998) Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *EMBO J* 17, 462-469
148. Nagai T, Iyata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, and Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotech* 20, 87-90
149. Nalbant P, Hodgson L, Kraynov V, Touthkine A, and Hahn KM (2004) Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science* 305, 1615-1619
150. Ni L, Xu W, Kumaraswami M, and Schumacher MA (2010) Plasmid protein TubR uses a distinct mode of HTH-DNA binding and recruits the prokaryotic tubulin homolog TubZ to effect DNA partition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11763-11768
151. Nierman WC, Feldblyum TV, Laub MT, Paulsen IT, Nelson KE, Eisen J, Heidelberg JF, Alley MRK, Ohta N, Maddock JR, Potocka I, Nelson WC, Newton A, Stephens C, Phadke ND, Ely B, DeBoy RT, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Kolonay JF, Smit J, Craven MB, Khouri H, Shetty J, Berry K, Utterback T, Tran K, Wolf A, Vamathevan J, Ermolaeva M, White O, Salzberg SL, Venter JC, Shapiro L, and Fraser CM (2001) Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4136-4141
152. Niethammer P, Bastiaens P, and Karsenti E (2004) Stathmin-tubulin interaction gradients in motile and mitotic cells. *Science* 303, 1862-1866
153. Niki H, and Hiraga S (1997) Subcellular distribution of actively partitioning F plasmid during the cell division cycle in *E. coli*. *Cell* 90, 951-957
154. Nogales E, Downing KH, Amos LA, and Lowe J (1998) Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol* 5, 451-458
155. Ogura Y, Ogasawara N, Harry EJ, and Moriya S (2003) Increasing the ratio of Soj to Spo0J promotes replication initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 185, 6316-6324
156. Oliferenko S, Chew TG, and Balasubramanian MK (2009) Positioning cytokinesis. *Genes Dev* 23, 660-674
157. Oliva MA, Cordell SC, and Lowe J (2004) Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1243-1250
158. Orlova A, Garner EC, Galkin VE, Heuser J, Mullins RD, and Egelman EH (2007) The structure of bacterial ParM filaments. *Nat Struct Mol Biol* 14, 921-926
159. Osawa M, Anderson DE, and Erickson HP (2009) Curved FtsZ protofilaments generate bending forces on liposome membranes. *EMBO J* 28, 3476-3484
160. Osawa M, Anderson DE, and Erickson HP (2008) Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes. *Science* 320, 792-794

161. Patrick JE, and Kearns DB (2008) MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 70, 1166-1179
162. Poindexter JS, and Staley JT (1996) *Caulobacter* and *Asticcacaulis* stalk bands as indicators of stalk age. *J Bacteriol* 178, 3939-3948
163. Popp D, Narita A, Oda T, Fujisawa T, Matsuo H, Nitani Y, Iwasa M, Maeda K, Onishi H, and Maeda Y (2008) Molecular structure of the ParM polymer and the mechanism leading to its nucleotide-driven dynamic instability. *EMBO J* 27, 570-579
164. Potterton L, McNicholas S, Krissinel E, Gruber J, Cowtan K, Emsley P, Murshudov GN, Cohen S, Perrakis A, and Noble M (2004) Developments in the CCP4 molecular-graphics project. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2288-2294
165. Pratto F, Cicek A, Weihofen WA, Lurz R, Saenger W, and Alonso JC (2008) *Streptococcus pyogenes* pSM19035 requires dynamic assembly of ATP-bound ParA and ParB on *parS* DNA during plasmid segregation. *Nucleic Acids Res* 36, 3676-3689
166. Ptacin JL, Lee SF, Garner EC, Toro E, Eckart M, Comolli LR, Moerner WE, and Shapiro L (2010) A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 12, 791-798
167. Quisel JD, Lin DC-H, and Grossman AD (1999) Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol Cell* 4, 665-672
168. Quon KC, Marczyński GT, and Shapiro L (1996) Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* 84, 83-93
169. Quon KC, Yang B, Domian IJ, Shapiro L, and Marczyński GT (1998) Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 120-125
170. Radhakrishnan SK, Pritchard S, and Viollier PH (2010) Coupling prokaryotic cell fate and division control with a bifunctional and oscillating oxidoreductase homolog. *Dev Cell* 18, 90-101
171. Radnedge L, Youngren B, Davis M, and Austin S (1998) Probing the structure of complex macromolecular interactions by homolog specificity scanning: the P1 and P7 plasmid partition systems. *EMBO J* 17, 6076-6085
172. Raskin DM, and de Boer PA (1999) Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4971-4976
173. Redick SD, Stricker J, Briscoe G, and Erickson HP (2005) Mutants of FtsZ targeting the protofilament interface: effects on cell division and GTPase activity. *J Bacteriol* 187, 2727-2736
174. Ringgaard S, Lowe J, and Gerdes K (2007) Centromere pairing by a plasmid-encoded type I ParB protein. *J Biol Chem* 282, 28216-28225
175. Ringgaard S, van Zon J, Howard M, and Gerdes K (2009) Movement and equipositioning of plasmids by ParA filament disassembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 19369-19374
176. Romberg L, and Mitchison TJ (2004) Rate-limiting guanosine 5'-triphosphate hydrolysis during nucleotide turnover by FtsZ, a prokaryotic tubulin homologue involved in bacterial cell division. *Biochemistry* 43, 282-288
177. Romberg L, Simon M, and Erickson HP (2001) Polymerization of Ftsz, a bacterial homolog of tubulin: is assembly cooperative? *J Biol Chem* 276, 11743-11753

178. Salje J, and Lowe J (2008) Bacterial actin: architecture of the ParMRC plasmid DNA partitioning complex. *EMBO J* 27, 2230-2238
179. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
180. Savage DF, Afonso B, Chen AH, and Silver PA (2010) Spatially ordered dynamics of the bacterial carbon fixation machinery. *Science* 327, 1258-1261
181. Scheffers DJ, de Wit JG, den Blaauwen T, and Driessen AJ (2002) GTP hydrolysis of cell division protein FtsZ: evidence that the active site is formed by the association of monomers. *Biochemistry* 41, 521-529
182. Schindelin H, Kisker C, Schlessman JL, Howard JB, and Rees DC (1997) Structure of ADP:AIF<sub>4</sub>-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature* 387, 370-376
183. Schofield WB, Lim HC, and Jacobs-Wagner C (2010) Cell cycle coordination and regulation of bacterial chromosome segregation dynamics by polarly localized proteins. *EMBO J* 29, 3068-3081
184. Scholefield G, Whiting R, Errington J, and Murray H (2011) Spo0J regulates the oligomeric state of Soj to trigger its switch from an activator to an inhibitor of DNA replication initiation. *Mol Microbiol* 79, 1089-1100
185. Schumacher MA (2008) Structural biology of plasmid partition: uncovering the molecular mechanisms of DNA segregation. *Biochem J* 412, 1-18
186. Sharpe ME, and Errington J (1996) The *Bacillus subtilis* *soj-spo0J* locus is required for a centromere-like function involved in prespore chromosome partitioning. *Mol Microbiol* 21, 501-509
187. Shebelut CW, Guberman JM, van Teeffelen S, Yakhnina AA, and Gitai Z (2010) *Caulobacter* chromosome segregation is an ordered multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14194-14198
188. Shen B, and Lutkenhaus J (2009) The conserved C-terminal tail of FtsZ is required for the septal localization and division inhibitory activity of MinC<sup>C</sup>/MinD. *Mol Microbiol* 72, 410-424
189. Shen B, and Lutkenhaus J (2010) Examination of the interaction between FtsZ and MinC<sup>N</sup> in *E. coli* suggests how MinC disrupts Z rings. *Mol Microbiol* 75, 1285-1298
190. Stamatakis A, Hoover P, and Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Syst Biol* 57, 758-771
191. Stricker J, Maddox P, Salmon ED, and Erickson HP (2002) Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 3171-3175
192. Stryer L (1968) Fluorescence spectroscopy of proteins. *Science* 162, 526-533
193. Suefuiji K, Valluzzi R, and RayChaudhuri D (2002) Dynamic assembly of MinD into filament bundles modulated by ATP, phospholipids, and MinE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16776-16781
194. Szeto TH, Rowland SL, Rothfield LJ, and King GF (2002) Membrane localization of MinD is mediated by a C-terminal motif that is conserved across eubacteria, archaea, and chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15693-15698

195. Terrana B, and Newton A (1975) Pattern of unequal cell division and development in *Caulobacter crescentus*. *Dev Biol* 44, 380-385
196. Thanbichler M (2010) Synchronization of chromosome dynamics and cell division in bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000331
197. Thanbichler M, Iniesta AA, and Shapiro L (2007) A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* 35, e137
198. Thanbichler M, and Shapiro L (2006) Chromosome organization and segregation in bacteria. *J Struct Biol* 156, 292-303
199. Thanbichler M, and Shapiro L (2008) Getting organized - how bacterial cells move proteins and DNA. *Nat Rev Micro* 6, 28-40
200. Thanbichler M, and Shapiro L (2006) MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell* 126, 147-162
201. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, and Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882
202. Thompson SR, Wadhams GH, and Armitage JP (2006) The positioning of cytoplasmic protein clusters in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8209-8214
203. Tonthat NK, Arold ST, Pickering BF, Van Dyke MW, Liang S, Lu Y, Beuria TK, Margolin W, and Schumacher MA (2011) Molecular mechanism by which the nucleoid occlusion factor, SlmA, keeps cytokinesis in check. *EMBO J* 30, 154-164
204. Toro E, Hong S-H, McAdams HH, and Shapiro L (2008) *Caulobacter* requires a dedicated mechanism to initiate chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 15435-15440
205. Tostevin F (2011) Precision of sensing cell length via concentration gradients. *Biophys J* 100, 294-303
206. Vecchiarelli AG, Han YW, Tan X, Mizuuchi M, Ghirlando R, Biertumpfel C, Funnell BE, and Mizuuchi K (2010) ATP control of dynamic P1 ParA-DNA interactions: a key role for the nucleoid in plasmid partition. *Mol Microbiol* 78, 78-91
207. Vetter IR, and Wittinghofer A (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304
208. Viollier PH, Thanbichler M, McGrath PT, West L, Meewan M, McAdams HH, and Shapiro L (2004) Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 9257-9262
209. Wang D, and Portis AR, Jr. (2006) Two conserved tryptophan residues are responsible for intrinsic fluorescence enhancement in Rubisco activase upon ATP binding. *Photosynth Res* 88, 185-193
210. Wang ZY, and Portis AR, Jr. (1991) A fluorometric study with 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (ANS) of the interactions of ATP and ADP with rubisco activase. *Biochim Biophys Acta* 1079, 263-267
211. Wartlick O, Kicheva A, and Gonzalez-Gaitan M (2009) Morphogen gradient formation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a001255

212. Willemse J, Borst JW, de Waal E, Bisseling T, and van Wezel GP (2011) Positive control of cell division: FtsZ is recruited by SsgB during sporulation of *Streptomyces*. *Genes Dev* 25, 89-99
213. Woldringh CL, Mulder E, Huls PG, and Vischer N (1991) Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. *Res Microbiol* 142, 309-320
214. Wolpert L (1969) Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* 25, 1-47
215. Wu LJ, and Errington J (2004) Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* 117, 915-925
216. Wu LJ, and Errington J (2002) A large dispersed chromosomal region required for chromosome segregation in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *EMBO J* 21, 4001-4011
217. Wu LJ, and Errington J (2003) RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49, 1463-1475
218. Wu LJ, Ishikawa S, Kawai Y, Oshima T, Ogasawara N, and Errington J (2009) Noc protein binds to specific DNA sequences to coordinate cell division with chromosome segregation. *EMBO J* 28, 1940-1952
219. Wu W, Park KT, Holyoak T, and Lutkenhaus J (2011) Determination of the structure of the MinD-ATP complex reveals the orientation of MinD on the membrane and the relative location of the binding sites for MinE and MinC. *Mol Microbiol* 79, 1515-1528
220. Yamaichi Y, Fogel MA, McLeod SM, Hui MP, and Waldor MK (2007) Distinct centromere-like *parS* sites on the two chromosomes of *Vibrio spp.* *J Bacteriol* 189, 5314-5324
221. Yamaichi Y, and Niki H (2000) Active segregation by the *Bacillus subtilis* partitioning system in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14656-14661
222. Yamaichi Y, and Niki H (2004) *migS*, a cis-acting site that affects bipolar positioning of *oriC* on the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J* 23, 221-233
223. Zhou H, Schulze R, Cox S, Saez C, Hu Z, and Lutkenhaus J (2005) Analysis of MinD mutations reveals residues required for MinE stimulation of the MinD ATPase and residues required for MinC interaction. *J Bacteriol* 187, 629-638





# ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die P-loop-ATPase MipZ

Mechanismus der Bildung eines Proteingradienten in einer prokaryotischen Zelle“

Selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 18.03.2011

---

Daniela Kiekebusch



# DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit in der einen oder anderen Weise beigetragen haben.

Zu allererst gilt mein besonderer Dank Jun.-Prof. Dr. Martin Thanbichler für die Vergabe des äußerst interessanten und methodisch breit aufgestellten Themas, die ausgezeichnete Betreuung und dafür, dass er stets sofort bereit war, auf meine Fragen zu antworten, auch wenn ich vielleicht nicht immer im passenden Moment aufgekreuzt bin.

Prof. Dr. Erhard Bremer danke ich für die ohne zu Zögern übernommene Zweitgutachterschaft meiner Arbeit.

Ein ganz besonderes Dankeschön an Anke, Katja, Jürgen und Andi, die nicht nein sagen konnten und sich durch Teile dieser Arbeit gekämpft und mir viele hilfreiche Hinweise gegeben haben.

Vielen Dank an Mischa, der mir meine vielen Fragen zu seinen Modellierungen bereitwillig und auch für mich unglaublich verständlich beantwortet hat.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Prokaryotische Zellbiologie“ möchte ich ein herzliches Dankeschön sagen, für eine ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre, in der immer Zeit für einen Spaß oder eine Kaffeepause war. Vielen lieben Dank an meine „Banknachbarin“, Susan, für eine tolle Zeit in unserem Labor, mit vielen interessanten Diskussionen und Gesprächen, oft sogar ohne Worte. Ebenfalls ein besonderes Dankeschön an Steffi, für ihr tolles Wesen, ihr ansteckendes Lachen und ihre stete Bereitschaft, hilfreich zur Seite zu stehen, vor allem wenn ich mal wieder etwas nicht finden konnte. Ihr seid mir gute Freunde geworden, die ich nicht mehr missen möchte.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Bachelorarbeit von Aljona Gutschmidt betreut. Bei ihr möchte ich mich nicht nur für die gute Zusammenarbeit, sondern auch die Bereitschaft, unzählige  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätstests durchzuführen, bedanken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Abteilung Ökophysiologie, für drei angenehme Arbeitsjahre in einem sehr gut organisierten Department. Vor allem möchte ich hier Anja, Jürgen, Andi und Katha erwähnen, neu gewonnene Freunde, ohne die meine Zeit in Marburg nur halb so schön gewesen wäre.

An letzter Stelle, aber von oberster Priorität, gilt mein besonderer Dank meinen lieben Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht und mich stets voll und ganz in allen meinen Entscheidungen unterstützt haben. Nun ist auch Eure Behauptung, ich hätte eine „Doktor“-Schrift, nicht mehr ganz so abwegig.



